

Universidad de Córdoba

Facultad de veterinaria

Programa de Doctorado en Biociencias y Ciencias Agroalimentarias



**Estudio de la actividad antimicrobiana de diversos
aceites esenciales y sus principales componentes
activos para el control de la infección por
*Streptococcus suis***

Study of antimicrobial activity of various essential oils and their
main active components for the control of *Streptococcus suis*
infection

Autora: Fabiana Carolina de Aguiar

Directora: Dra. Belén Huerta Lorenzo

Córdoba, España

Octubre de 2018

TITULO: *ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE DIVERSOS
ACEITES ESENCIALES Y SUS PRINCIPALES COMPONENTES
ACTIVOS PARA EL CONTROL DE LA INFECCIÓN POR
STREPTOCOCCUS SUI*

AUTOR: *Fabiana Carolina de Aguiar*

© Edita: UCOPress. 2018
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE DIVERSOS ACEITES ESENCIALES Y SUS PRINCIPALES COMPONENTES ACTIVOS PARA EL CONTROL DE LA INFECCIÓN POR *Streptococcus suis*.

DOCTORANDA: Fabiana Carolina de Aguiar

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La Tesis presentada por la doctoranda Dña. Fabiana C. de Aguiar, titulada en Medicina Veterinaria por la Universidad do Estado de Santa Catarina (UDESC, Brasil), se ha realizado dentro de la línea de investigación que el grupo PAI AGR256 de la Junta de Andalucía viene desarrollando desde hace dos décadas sobre el “Estudio de alternativas naturales para el control de las infecciones animales”. El principal objetivo de esta Tesis fue valorar el potencial de diversos aceites esenciales y sus principales componentes activos, solos o en combinación con antimicrobianos tradicionales, para el control de un agente zoonótico de gran relevancia en Sanidad Animal, como *Streptococcus suis*. El proyecto de investigación planteado supuso el aprendizaje y puesta a punto de nuevas técnicas microbiológicas y un arduo trabajo de laboratorio, actividades que la doctoranda desarrolló con alta eficiencia y profesionalidad, completando, si fue preciso, su formación con cursos especializados. Para la obtención de la Mención Internacional ha realizado, asimismo, una estancia de tres meses en la Università Politecnica delle Marche (Ancona, Italia), colaborando en diversos proyectos sobre aceites esenciales del grupo de investigación dirigido por la Dra. Bruna Facinelli.

Esta Tesis constituye el primer estudio en profundidad sobre la susceptibilidad de *S. suis* a los aceites esenciales y sus componentes activos. Los hallazgos obtenidos apoyan la utilización de estos productos como medida para reducir la dispersión de cepas multirresistentes y aportan parámetros microbiológicos y farmacocinéticos de gran interés para el diseño de pautas correctas de administración. Los resultados, de notable relevancia por su novedad y calidad científica, han sido aceptados para su divulgación en diversos congresos de ámbito nacional (4) e internacional (5) y la revista científica MicrobiologyOpen, indexada en Journal of Citation Reports (JCR). Además, otro artículo derivado de la tesis se encuentra en segunda revisión en la revista Journal of Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.

Las publicaciones/aportaciones a congreso derivados de la tesis han sido:

Revistas científicas

- Aguiar, F., Solarte, A.L., Tarradas, C., Luque, I., Maldonado, A., Galan-Relaño, A., Huerta, B., 2018. Antimicrobial activity of selected essential oils against *Streptococcus suis* isolated from pigs. *Microbiology open*, e613. DOI: 10.1002/mbo3.613. (Microbiology Q2, IF 2017: 2.682).
- Aguiar, F., Solarte, A.L., Tarradas, C., Luque, I., Maldonado, A., Huerta, B., 2017. Combined effect of conventional antimicrobials with essential oils and their main components against resistant *Streptococcus suis* strains. Manuscript under review in *Comparative Immunology, Microbiology and Infect Diseases*. (Veterinary Sciences Q1, IF: 1.920).

Congresos internacionales

- De Aguiar F., Solarte A. L., Tarradas C., Luque I., Maldonado A., Astorga R., Barrero-Domínguez B., Galán-Relaño A. and Huerta B. Antimicrobial effect of cinnamaldehyde, carvacrol and thymol and their combined effect with penicillin and trimethoprim-sulfamethoxazole against resistant *Streptococcus suis* strains IV *Conference on Antimicrobial Research*. Torremolinos, Spain (2018). Tipo de participación: Virtual presentation
- De Aguiar F., Solarte A. L., Tarradas C., Luque I., Astorga R. J., Maldonado A. and Huerta B. Combined effect of Gentamicin and Oxytetracycline with essential oils and their main components against resistance *Streptococcus suis* strains. 10th European Symposium of porcine health management, ESPHM. Barcelona, Spain (2018). Tipo de participación: Poster
- De Aguiar F., Solarte A. L., Tarradas C., Luque I., Barrero-Domínguez B., Lorenzo B. Combination of essential oils and antibiotics against *Streptococcus suis*: a preliminary study. 12th Safepork. Foz do Iguaçu, Brazil (2017). Tipo de participación: Poster
- De Aguiar F., Solarte A. L., Gómez Gascón L., Tarradas C., Luque, I., Galan-Relaño A., Huerta B. Antimicrobial activity of five essential oils against *Streptococcus suis*. IV *Conference on Antimicrobial Research*. Torremolinos, Spain (2016). Tipo de participación: Poster
- De Aguiar F., Solarte A. L., Galán-Relaño A., Barrero-Domínguez B., Luque I., Lorenzo B. 2017. Distribution of sensitivity of *Streptococcus suis* strains against various essential oils. 9th *European Symposium of porcine health management, ESPHM*, Prague, Czech Republic (2017). Tipo de participación: Poster

Congresos nacionales

- De Aguiar F., Solarte A. L., Luque I., Tarradas C., Barrero-Domínguez B. y Huerta B. Efecto combinado entre aceites esenciales y antimicrobianos frente a cepas resistentes de *Streptococcus suis*. XXII Simposio de la Asociación de Veterinarios Especialistas en Diagnóstico de Laboratorio (AVEDILA), Valladolid, España (2017). Tipo de participación: Poster
- De Aguiar F., Maldonado A., Huerta B. Uso de aceites esenciales para el control de la infección por *Streptococcus suis* en el cerdo. V *Congreso Científico de Investigadores en formación de la UCO – Creando redes*. Córdoba, España (2016). Tipo de participación: Poster
- De Aguiar F., Solarte A. L., Gómez Gascón L., Barrero-Domínguez B., Luque I., Tarradas C., Huerta B., Estudio de la actividad antimicrobiana de diversos aceites esenciales frente a *Streptococcus suis*. XX *Simposio de la Asociación de Veterinarios*

Especialistas en Diagnóstico de Laboratorio (AVEDILA), Gijón, España (2015). Tipo de participación: Poster

- De Aguiar F., Solarte A. L., Galan-Relaño A., Tarradas C., Astorga R.J., Maldonado A., Huerta B. Estudio de la resistencia antimicrobiana de cepas de *Streptococcus suis* aisladas del ganado porcino en España. *XXI Simposio de la Asociación de Veterinarios Especialistas en Diagnóstico de Laboratorio (AVEDILA)*. Murcia, España (2016). Tipo de participación: Poster

Consideramos que este trabajo reúne las condiciones y calidad científica necesarias para optar al Grado de Doctor en Veterinaria.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 10 de octubre de 2018

Firma de la directora

Fdo.: Dra. Belén Huerta Lorenzo

“No permitas que me engañe el pensamiento de que ya sé bastante. Por el contrario, concédeme la fuerza, la alegría y la ambición de saber más cada día.”

(Oración diaria de un médico, atribuida a Maimónides)

A mi familia...

El firmante de la presente Tesis Doctoral ha disfrutado de una beca de *Doutorado Pleno no Exterior* (convocatoria DPE - CsF 2 - Portaria nº 49/2013) del programa *Ciências sem Fronteiras* de la *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) del Ministerio de Educación de Brasil. La realización de los estudios incluidos en esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al Grupo de investigación **Sanidad Animal: Diagnóstico y control de enfermedades AGR-256** de la Universidad de Córdoba. La estancia en el extranjero para la obtención de la Mención Internacional fue posible a través de la convocatoria **Becas Movilidad Internacional 2017/2018** de la Universidad de Córdoba.

Índice

Lista de Abreviatura	13
CAPÍTULO 1	
Introducción general.....	15
CAPÍTULO 2	
Revisión Bibliográfica	21
CAPÍTULO 3	
Objetivos/Objectives	51
CAPÍTULO 4	
Material y Métodos generales	55
CAPÍTULO 5	
Primer Objetivo.....	63
CAPÍTULO 6	
Segundo Objetivo.....	77
CAPÍTULO 7	
Tercer Objetivo.....	101
CAPÍTULO 8	
Discusión general	117
CAPÍTULO 9	
Conclusiones/Conclusions	123
CAPÍTULO 10	
Resumen/Summary	127
CAPÍTULO 11	
Agradecimientos.....	135
CAPÍTULO 12	
Referencias Bibliográficas	139
CAPÍTULO 13	
Anexos.....	159

Listado de Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AE: Aceite esencial

AFLP: Amplificación de fragmentos de restricción

AMB: Antimicrobiano

ATCC: *American Type Culture Collection* (Colección americana de cultivos tipo)

ATP: Adenosín trifosfato

ATPasa: Adenosin trifosfatasa

CE: Comunidad europea

CEF: Ceftiofur

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMB: Concentración mínima bactericida

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CMI^C: Concentración Mínima Inhibitoria Combinada

CN: Gentamicina

CPM: Concentración de Prevención de Mutantes

E: Eficacia de la actividad bacteriana

EMA: *European Medicines Agency*

ENR: Enrofloxacin

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

ECV/ECOFF: *Epidemiologic cutoff values* (CLSI/EUCAST)

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)

FCI: Fracción de la Concentración Inhibitoria

FCI_{índice}: Índice de la Fracción de la Concentración Inhibitoria

I+D: Investigación y desarrollo

ICC: Infusión Cerebro Coración

IPP: Difosfato de isopentenilo

LPS: Lipopolisacárido

MAPAMA: Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente de España

MH: Mueller-Hinton

MHS: Mueller-Hinton sangre desfibrinado de oveja

MLST: tipificación de múltiples locus

MPC: Concentración de Prevención de Mutantes

Ø: Diámetro

OCED: Organización para la cooperación económica y el Desarrollo

OIE: Organización Mundial de la Sanidad Animal

OMS: Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*)

OT: Oxitetraciclina

P: Penicilina G

PC: Principal componente

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PD: Farmacodinámica

PFGE: Electroforesis de campospulsantes

PNRA: Plan Nacional Resistencia Antibióticos

PK: Farmacocinética

PN: Producto natural

RAPD: PCR con iniciadores de secuencia arbitrarios

REA: análisis de patrones de restricción Ribotipado

REDOX: Reacciones de reducción y oxidación

RFLP: Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción

SNC: Sistema nervioso central

STSS: Síndrome de Shock Tóxico por Estreptococos

SXT: Trimethoprin-sulfametoxazole

TSA: Tripticasa soja agar

UE: Unión Europea

UFC: Unidad formadora de colonia

UI: Unidad internacional

Capítulo 1

Introducción general

Introducción general

Las especies de crecimiento rápido con un alto índice de conversión de alimentos, como los cerdos, contribuyen en gran medida al desarrollo del sector pecuario y al aumento de la demanda mundial de carne. La capacidad de adaptación a todos los ambientes climáticos y su calidad de omnívoro han determinado su presencia en casi todos los países del mundo, con una notable intensificación de su producción comercial en las últimas décadas (FAO, 2001). Tanto a nivel mundial como dentro de la Unión europea, España se considera uno de los países de mayor producción de ganado porcino, situándose como cuarto productor de carne de cerdo en el mundo y segundo de Europa, después de Alemania (MAPAMA, 2018). Desde un punto de vista económico, el sector porcino español tiene una importancia clave en nuestro país, supone el 12,7% de la Producción Final Agraria y el 37% de la Producción Final Ganadera (MAPAMA, 2018).

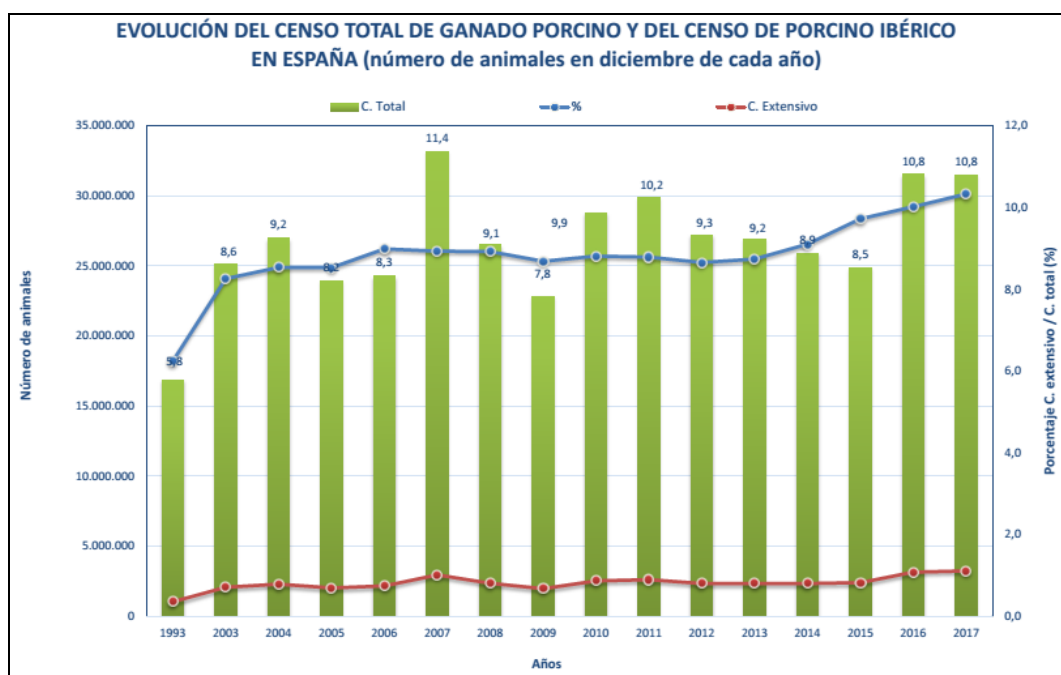


Figura 1. Evolución del censo porcino en España (Fuente: MAPAMA, 2018)

A diferencia de otros productores europeos, la producción y exportación de cerdo en España se incrementa cada año como resultado de una industria con un alto nivel de integración y costes más reducidos (Food y Water Europe, 2017). Este sector ha realizado un gran esfuerzo económico para adaptar sus instalaciones y sistemas productivos a la normativa europea sobre bienestar animal (Directiva 2008/120/CE), así

como a las exigencias de los consumidores que demandan productos de mayor calidad con los mínimos riesgos sanitarios. Estos elevados niveles de producción conllevan una alta tecnificación y sistemas de cría intensiva que favorecen la aparición de enfermedades multifactoriales y multicausales (de Souza *et al.*, 2008).

Entre las patologías que afectan al cerdo, las infecciones por *Streptococcus suis* han adquirido una importancia creciente en los últimos veinte años. Con una prevalencia de granjas infectadas cercana al 100%, *S. suis* es uno de los patógenos bacterianos más importantes del cerdo, causante del mayor porcentaje de muerte en lechones destetados en el mundo (Gottschalk *et al.*, 2010; Goyette-Desjardins *et al.*, 2014). *S. suis* tiene como hábitat natural el tracto respiratorio superior, especialmente tonsilas y cavidad nasal, el tracto genital y el aparato gastrointestinal del cerdo. Los animales portadores sanos desempeñan un importante papel en la diseminación y transmisión de este patógeno (Higgins y Gottschalk, 1990; Gottschalk y Segura, 2000; Luque *et al.*, 2009), siendo los responsables de la introducción y mantenimiento del microorganismo en las explotaciones (Cloutier *et al.* 2003; Luque *et al.*, 2010). La meningitis es la principal manifestación clínica del *S. suis*, si bien la enfermedad puede cursar también con artritis, endocarditis, bronconeumonía, poliserositis, septicemia y trastornos reproductivos. Su relevancia es especialmente alta en explotaciones donde se presentan otras enfermedades inmunosupresoras, como el Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino o la Circovirus, alcanzando tasas de mortalidad de hasta el veinte por ciento (Higgins y Gottschalk, 1990; Cloutier *et al.*, 2003).

Además de las pérdidas económicas para el sector porcino, *S. suis* tiene una gran repercusión sanitaria. La infección afecta fundamentalmente a trabajadores de la industria porcina, matarifes, carniceros y veterinarios, ocasionando meningitis aguda, y menos frecuentemente endocarditis, neumonía, artritis, peritonitis, septicemia y shock séptico, con una mortalidad de entre el 5% y el 80% (Lun *et al.*, 2007; Wertheim *et al.*, 2009). La distribución de la enfermedad es mundial, si bien la mayoría de casos se han registrado en el norte de Europa y sur de Asia, habiéndose descrito en las últimas décadas diversos brotes en distintas localizaciones, por lo que es considerada una zoonosis profesional emergente (Lun *et al.*, 2007; Wertheim *et al.*, 2009; Gottschalk *et al.*, 2010; Gottschalk, 2012;). La descripción de casos de *S.suis* en el hombre y su

importancia económica en las industrias porcinas obligan a poner en marcha eficaces medidas de lucha contra la enfermedad.

Uno de los principales problemas planteados en las explotaciones porcinas para luchar frente a las infecciones de *S. suis* es establecer eficaces medidas de control, puesto que la erradicación es un objetivo prácticamente irrealizable. Para controlar la enfermedad se ha utilizado durante mucho tiempo el tratamiento con antibióticos, principalmente beta-lactámicos aplicados en los distintos niveles de producción que han ido resolviendo el problema. Sin embargo, los datos publicados por la Agencia Europea del Medicamento muestran una situación alarmante en relación al uso excesivo de antibióticos empleados en producción porcina, dejando a nuestro país en una situación comprometida que obliga a tomar medidas efectivas para reducir su utilización. Las conclusiones del Consejo de la UE del 29 de mayo de 2012 proponían que los Estados Miembros de la UE deberían adoptar medidas para el control de las resistencias antimicrobianas (EC, 2013). La Agencia Española de Medicamentos y Productos sanitarios (AEMPS), propuso en 2014 un plan estratégico (AEMPS, 2015) de lucha contra la aparición de resistencias (Plan Nacional Resistencia Antibióticos, PNRA), para evitar la diseminación de resistencias bacterianas e ilustrar a la población sobre el riesgo de la aparición de microorganismos resistentes a los antibióticos (Muñoz y Porrero, 2017).

Una de las Líneas Estratégicas de dicho Plan, está orientada a definir las prioridades en el ámbito de la investigación, con dos aspectos fundamentales por un lado *Promover la investigación para el conocimiento de las resistencias a los antibióticos* y por otro *Promover la investigación de alternativas a los antibióticos* (AEMPS, 2015). En este último apartado se incluyen la utilización de otros productos como péptidos antimicrobianos, probióticos, enzimas recombinantes y aceites esenciales. Si bien muchos de estos productos parecen totalmente nuevos, algunos de ellos como los aceites esenciales han sido utilizados desde la antigüedad debido a sus propiedades medicinales (Rota *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que algunos aceites y sus principios activos muestran actividad antimicrobiana en condiciones *in vitro* frente a bacterias, así como una reducción considerable de la dosis de antibióticos necesaria cuando se usan combinados con aceites. Estudios realizados por nuestro grupo de investigación han demostrado el

potencial de la actividad de los AEs de canela, clavo, orégano y tomillos, frente a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus xylosus*) y Gram negativas (*E. coli*, *S. Choleraesuis*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*), aisladas en diversas especies animales, señalando variaciones en la susceptibilidad en función de la especie, serotipo y cepa (Gutiérrez *et al.*, 2006; Huerta *et al.*, 2004; Peñalver *et al.*, 2005; Solarte *et al.*, 2018).

La importancia económica y sanitaria que supone la presencia de *S. suis* en las explotaciones porcinas y la gran responsabilidad que tienen los veterinarios en la aparición y difusión de bacterias multirresistentes, hace necesario dedicar nuestros esfuerzos a profundizar el desarrollo de nuevas alternativas antimicrobianas frente a este patógeno. El principal objetivo de nuestra Tesis doctoral es determinar el potencial antimicrobiano frente a cepas de *Streptococcus suis* de algunos aceites esenciales y sus componentes, además de estudiar la sinergia con los principales antibióticos utilizados en la industria porcina y así poder disminuir la dosis. Estos objetivos se encuadran perfectamente en las líneas estratégicas del PNRA, que debe ser uno de los caballos de batalla de los grupos de investigación en el área de Sanidad Animal.

Capítulo 2

Revisión bibliográfica

Revisión Bibliográfica

Infecciones por Streptococcus suis

Las infecciones por *Streptococcus suis* suponen una de las principales dominantes patológicas del ganado porcino en la mayoría de los países productores de cerdos. Los sistemas de explotación modernos, con animales sometidos a una gran presión productiva y confinamiento, los intercambios comerciales, y la presencia de enfermedades inmunodepresoras (Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino, Circovirus, etc), han originado una mayor frecuencia de presentación de estos procesos (Higgins y Gottschalk, 2006). En el cerdo, las principales manifestaciones clínicas tras una infección por *S. suis* son alteraciones nerviosas, septicemias, poliartritis, endocarditis, alteraciones de la reproducción, poliserositis, y bronconeumonías (Luque *et al.*, 1998; Tarradas *et al.*, 2004; Higgins y Gottschalk, 2006).

Además de las pérdidas económicas que originan al sector porcino, las infecciones por *S. suis* tienen una marcada importancia sanitaria, dado el carácter zoonótico de esta enfermedad. En la especie humana, estas enfermedades suelen cursar con graves cuadros nerviosos, septicémicos y endocarditis, con tasas de mortalidad que oscilan entre el 5 y el 20 por ciento (Palmiere *et al.*, 2011). Actualmente, es considerada una enfermedad de carácter ocupacional, pues se presenta fundamentalmente en personas relacionadas con la industria del cerdo (Tarradas *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2006). El gran brote surgido en China en 2005, cambió el sentido de las investigaciones y ha obligado a muchos países a mantener un mayor celo en el control de este patógeno. Los brotes surgidos en algunas provincias asiáticas se han desarrollado con un tiempo de incubación más corto para el hombre, una progresión más rápida de la enfermedad y una tasa de mortalidad más elevada. En España, el primer caso humano se describió en el año 1994, y en los últimos años se han presentado casos sin relación con la manipulación de la carne de cerdo (Galbarro *et al.*, 2009). Todos estos factores, unidos al aumento progresivo de casos humanos, justifican sobradamente la atención que debe dedicarse al estudio de esta zoonosis por la comunidad científica (Gottschalk *et al.*, 2010).

La especie *Streptococcus suis* fue reconocida como una nueva especie en 1987 por Kilpper-Balz y Schleifer, quienes demostraron que era genéticamente homogénea y diferente de otros estreptococos. Según el *Manual Bergey's of Determinative Bacteriology*, el género *Streptococcus* se incluye dentro del grupo 17, que agrupa a los cocos Gram positivos no formadores de endosporas. En la segunda edición del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, el género se ha incluido en la sección XXII (bacilos y lactobacilos) del volumen 3 (bacterias Gram positivas con bajo contenido en C+G) dentro de la familia *Streptococcaceae* (Vos *et al.*, 2011).

Los estreptococos son cocos Gram positivos, redondeados u ovoides, con un diámetro inferior a dos micrómetros, y agrupados en parejas, o bien en cadenas de longitud variable. La célula estreptocócica, como otras bacterias Gram positivas, se compone de una pared celular que le confiere rigidez, formada por una capa gruesa de peptidoglucanos, carbohidratos específicos de grupo, unidos a la capa de peptidoglucanos mediante enlaces covalentes (Heraud y Le Bouguenec, 1989), proteínas y ácidos teicoicos. Además, presentan una cápsula, que es una estructura amorfa de naturaleza polisacáridica, no inmunógena, que se encuentra débilmente unida a la pared celular.

Streptococcus suis requiere medios enriquecidos para su crecimiento, como Agar Sangre, adicionado de sangre ovina desfibrinada y estéril, donde tras 24 o 48 horas crece como pequeñas colonias α -hemolíticas con un diámetro de 0,5-1 mm, grisáceas o transparentes y levemente mucoides. En la tinción de Gram se observan células cocáceas ovoides, inferiores 2 μ m de diámetro, que pueden aparecer aisladas, en pares y en cortas cadenas. Se han propuesto una serie de parámetros marcadores para la especie, como la hidrólisis de esculina y fermentación de trehalosa, la producción de amilasa, incapacidad de crecer en un medio con un 6'5 % de cloruro sódico y de producir acetoina (Tarradas *et al.*, 1994; Vos *et al.*, 2011). Es inmóvil, catalasa negativa, presenta metabolismo fermentativo produciendo ácido a partir de algunos azúcares y es anaerobio facultativo. Además, es leucino-amino-peptidasa (LAP) positiva y pirrolidonyl-arylamidasa (PYR) negativa y resistente a optoquina. Atendiendo a la clasificación de Lancefield, que agrupa a los estreptococos en base a los carbohidratos de la pared celular, reacciona con los grupos R, S, RS y T, aunque algunos pueden reaccionar con el grupo D (Alarcón, 2012; Vos *et al.*, 2011).

Atendiendo a sus antígenos capsulares de naturaleza polisacáridica (CPS), se han reconocido hasta 35 serotipos, no obstante esta clasificación está en continua revisión, en el año 2005 se propuso la reclasificación de los serotipos 32 y 34 en la especie *Streptococcus orisratti* (Hill *et al.*, 2005; Okura *et al.*, 2016). Asimismo, en base a los estudios basados en la secuenciación de los genes *sodA* (codifica la superóxido dismutasa) y *recN* (codifica una proteína de recombinación/reparación), se propuso que los serotipos 20, 22, 26 y 33 pertenecerían a la especie *Streptococcus parasuis* en eliminar los serotipos 20, 22, 26 y 33 (Okura *et al.*, 2013; Tien *et al.*, 2013). Recientemente, se ha identificado una nueva variante de la especie *S. suis* en aislados procedentes de cerdos con meningitis, que no pertenecen a ninguno de los serotipos descritos (Pan *et al.*, 2015; Okura *et al.*, 2016).

Desde un punto de vista epidemiológico, el principal reservorio de la enfermedad es la especie porcina, la bacteria puede quedar acantonada en tonsilas y cavidad nasal de los animales fundamentalmente, aunque también ha podido ser aislado de secreciones lácteas, tracto gastrointestinal, nódulos linfáticos, pulmones, vagina y prepucio de individuos sin manifestaciones clínicas, denominados a partir de ese momento portadores tonsilares (Berthelot-Hérault *et al.*, 2001). Estos animales son responsables del mantenimiento de la bacteria y representan la principal fuente de infección para los animales y para el hombre (Robertson y Blackmore, 1989; Berthelot-Hérault *et al.*, 2001). Clásicamente, se ha considerado que estas cepas podrían ser de menor virulencia, pero hoy se cuestiona este punto, ya que algunos trabajos demuestran similitud en cepas clínicas y tonsilares (Blume *et al.*, 2009). En estudios realizados por nuestro grupo de investigación en una granja con antecedentes de la enfermedad, se comprueba que con el tiempo, van apareciendo grupos de cepas genéticamente diferentes que circulan a lo largo de todas las fases productivas y son responsables de los brotes de enfermedad, siendo los animales adultos los principales reservorios (Luque *et al.*, 2010).

De todos los serotipos de *S. suis* descritos, los más frecuentemente aislados de casos clínicos en cerdos, son en orden decreciente el 2, 9, 3, 1/2 y 7. Se han descrito asimismo variaciones en la distribución de los serotipos en función del área geográfica y el tiempo (Wisselink *et al.*, 2000; Tarradas *et al.*, 2001, 2004; Vela *et al.*, 2003; Baums *et al.*, 2009; Fittipaldi *et al.*, 2009; Wei y Zhang, 2009; Gottschalk *et al.*, 2013). En

América del Norte, los serotipos más prevalentes son el 2 y el 3, mientras que, en América del Sur parece ser que el serotipo 2 es el más prevalente, seguidos por los serotipos 1/2, 14, 7 y 9. Por otra parte, en Asia los serotipos más prevalentes son el 2, 3, 4, 7 y 8 (Goyette-Desjardins *et al.*, 2014). Los serotipos 2 y 9 son los más frecuentes en las explotaciones porcinas de Europa, incluida España (Tarradas *et al.*, 2004), aunque otros serotipos, como el 1, 1/2, 4, 7 y 14, también son responsables de enfermedad (Higgins y Gottschalk, 2006; Goyette-Desjardins *et al.*, 2014).

Como se ha indicado, *S. suis* puede afectar al hombre, el primer caso descrito humanos data del año 1968 en Dinamarca (Arends y Zanen, 1988), posteriormente se han descrito casos en varios países de Europa, Asia, así como en el Norte y Sur de América, Australia y Nueva Zelanda (Gottschalk *et al.*, 2010; Wertheim *et al.*, 2009), hasta un total de 1642 casos (Goyette-Desjardins *et al.*, 2014). De los serotipos descritos, los serotipos Los tipos capsulares aislados en pacientes humanos han sido el 2, 4 y 14 han sido los más importantes, siendo el serotipo 2 el más frecuentemente aislado (74.7% de los casos), seguido por el serotipo 14 con el 2.0%. La mayoría de los casos se han notificado en Asia, que representan más del 90% de los casos, especialmente en Vietnam, Tailandia y China. Entre los años 1998 y 2005 se produjeron dos grandes brotes en zonas rurales de China (Yu *et al.*, 2006), el de 2005, causó 204 infecciones en humanos y 38 muertes. En Vietnam, *S. suis* es la causa más frecuente de meningitis bacteriana adulta (Goyette-Desjardins *et al.*, 2014). Europa es el segundo continente donde se han descrito la mayoría de las infecciones humanas, representando el 8,5% de todos los casos notificados, de estos, aproximadamente el 71,4% se han descrito en países con una industria porcina altamente desarrollada, como Holanda, Reino Unido, Francia y España. En otros países, como América del Norte, América del Sur (Argentina, Chile y Guyana Francesa) y Oceanía (Australia y Nueva Zelanda), se han presentado casos esporádicos, representando el 0,8% de todos los casos notificados (Goyette-Desjardins *et al.*, 2014).

En general, se considera una enfermedad ocupacional, pues principalmente afecta a personas en contacto directo con los cerdos infectados o sus productos, aunque en Asia, esta bacteria afecta a la población corriente y representa un importante problema de salud pública, debido a los hábitos alimentario (ingestión de sangre y carne de cerdo cruda o mal cocida) y las malas condiciones de higiene y de sanidad de las

zonas rurales (Wertheim *et al.*, 2009). En la especie humana, *Streptococcus suis* puede causar diversos procesos como septicemia, meningitis y endocarditis, y el Síndrome de Shock Tóxico por Estreptococos (STSS), nueva forma clínica conocida tras los brotes que se presentaron en China, y caracterizada por la aparición repentina de fiebre alta y de una erupción eritematosa, acompañada de palidez, petequias y disfunción multiorgánica (Lun *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2010). La vía de entrada son pequeñas heridas y abrasiones de la piel, además de la vía oral. El periodo de incubación es muy variable y oscila entre unas horas y dos días (Gottschalk *et al.*, 2010).

La introducción de cerdos portadores de *S. suis* en granjas no infectadas, puede dar lugar a la aparición de la enfermedad en las mismas; las cerdas portadoras sanas infectan por vía respiratoria y oral a sus propios lechones y éstos, a su vez, a otros lechones en el momento de las reagrupaciones, después del destete o tras su entrada en el cebadero (Madsen *et al.*, 2002; Cloutier *et al.*, 2003; Goyette-Desjardins *et al.*, 2014).

La capacidad de las bacterias para colonizar los tejidos del huésped es un paso crítico en el inicio de la infección (Baums y Valentin-Weigand, 2009), *S. suis* se une a proteínas de la matriz extracelular del hospedador, que incluyen fibronectina y colágeno (Esgleas *et al.*, 2005), así como a células endoteliales y epiteliales (Charland *et al.*, 1998; Benga *et al.*, 2004). Sin embargo, todavía no se conocen los verdaderos mecanismos de acción patógena (Higgins *et al.*, 2006; Garibaldi *et al.*, 2010; Fittipaldi *et al.*, 2008). Las investigaciones realizadas demuestran que durante el transcurso de la infección, *S. suis* libera polisacáridos capsulares, proteínas de pared celular, de membrana o proteínas secretadas, que intervienen en la patogénesis (Higgins *et al.*, 2006; Garibaldi *et al.*, 2010; Grenier, 2007; Fittipaldi *et al.*, 2008).

La enfermedad causada por *S. suis* es más prevalente en los sistemas modernos de explotación, en sistemas totalmente confinados (con una alta densidad de población), y con relaciones entre temperatura y ventilación no adecuadas, donde aparecen brotes a lo largo de todo el año (Erickson *et al.*, 1984; Clifton-Hadley, 1984;). Autores como Dee y cols., (1993), consideran que los factores que más influyen en el incremento de portadores en una granja son las fluctuaciones de temperatura en la sala de partos, una excesiva humedad relativa, convivencia de animales de distinta edad, una alta densidad de población, así como la existencia de suelos que facilitan el acúmulo de polvo y estiércol.

La edad de aparición de la enfermedad y los signos clínicos varían según las condiciones de la explotación y la virulencia de la cepa. El período de incubación suele ser corto (24h). En la mayoría de los casos, los primeros signos de enfermedad suelen observarse en lechones lactantes o tras el destete, en los que se presenta un síndrome febril, con temperaturas elevadas, de 41 a 42°C y anorexia, evolucionando rápidamente hacia la muerte (Madec *et al.*, 1985; Gottschalk, 2012). En brotes sobreagudos el primer signo es la aparición de 2 o 3 cerdos muertos. Cuando el curso de la enfermedad no es tan rápido, se observan cojera y entumecimiento de las articulaciones, característicos de artritis en los animales afectados (Gottschalk, 2012).

La infección por *S. suis* en los cerdos está frecuentemente asociada a meningitis, septicemia y muerte súbita por shock séptico, artritis, endocarditis, poliserositis y neumonía. También puede producir problemas reproductivos de las cerdas, que pueden cursar con repeticiones de celo, acompañados de descargas vulvares de carácter mucopurulento (Gottschalk, 2012) y abortos en las dos últimas semanas de gestación, con la expulsión de camadas completas, así como la presencia en algunas camadas de lechones débiles al nacimiento (Tarradas *et al.*, 1994).

El papel de *S. suis* en la producción de cuadros respiratorios ha sido muy discutido, al ser el pulmón un lugar de acantonamiento de la bacteria, además la mayoría de las veces se aíslan con otros microorganismos responsables del Síndrome Respiratorio Porcino (virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino, Circovirus Porcino tipo 2, Influenzavirus, *Pasteurella*, *Bordetella*, *Mycoplasma*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*), siendo por tanto considerado como un responsable más de esta enfermedad multifactorial (King *et al.*, 2002; Goyette-Desjardins *et al.*, 2014).

Las tasas de enfermedad en las infecciones por *S. suis* son extremadamente variables, estando condicionadas a los serotipos implicados, edad, formas clínicas, sistema de cría y calidad sanitaria de las explotaciones afectadas; también pueden influir factores externos, fundamentalmente medio ambientales (Madec *et al.*, 1985; Vaissaire *et al.*, 1985; Robertson y Blackmore, 1989). Según Vaissaire y cols., (1985), las tasas de morbilidad y mortalidad desarrolladas por *S. suis* alcanzan valores máximos del 50 y 20 por ciento, respectivamente; sin embargo, en las formas nerviosas, si bien la morbilidad

y mortalidad no suele superar el 10 por ciento, la letalidad puede alcanzar al cien por cien de los individuos afectados (Vaissaire *et al.*, 1985; Sala *et al.*, 1990).

El diagnóstico presuntivo de infección en cerdos generalmente se basa en datos epidemiológicos, en signos clínicos y lesiones macroscópicas. La confirmación se basa en el aislamiento y la caracterización del agente patógeno (Madec *et al.*, 1985; Goyette-Desjardins *et al.*, 2014). Para el primoaislamiento se aconseja la utilización de medios enriquecidos, como el Agar Sangre adicionado de sangre ovina desfibrinada y estéril o medios selectivos, como el Agar Columbia, adicionado de sangre ovina y un suplemento antibiótico de colistin sulfato y ácido nalidíxico, que inhiba el crecimiento de microorganismos Gram negativos (Tarradas *et al.*, 1998). Tras la incubación a 37 °C durante 24-48 horas en condiciones de aerobiosis o microaerofilia se obtienen las colonias alfa-hemolíticas características, a las que se les aplican pruebas bioquímicas (catalasa, oxidasa, voges-proskauer, amilasa, crecimiento en presencia de un 6,5% de NaCl) y confirmación con técnicas de PCR, para la detección del gen de la glutamato-deshidrogenasa (*gdh*), de 688pb (Okwumabua *et al.*, 2003). Hoy en día, se han desarrollado otras técnicas de PCR sencillas o múltiples, que permiten la detección de uno o varios serotipos y potenciales factores de virulencia de *S. suis* (Wisselink *et al.*, 2002; Marois *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2012). Recientemente, se ha descrito una PCR múltiple para la detección de los serotipos descritos (Liu *et al.*, 2013).

Además de las técnicas de PCR, se han desarrollado otros métodos moleculares, como el análisis de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP), electroforesis de campos pulsantes (PFGE), el análisis de patrones de restricción (REA), Ribotipado, PCR con iniciadores de secuencia arbitrarios (RAPD) y la tipificación de múltiples locus (MLST) o el estudio de la amplificación de fragmentos de restricción (AFLP) que han permitido establecer la relación clonal y la diversidad entre aislamientos, lo que ha supuesto un gran avance para abordar estudios epidemiológicos (Tarradas *et al.*, 2001; King *et al.*, 2002; Cloutier *et al.*, 2003; Vela *et al.*, 2003; Okura *et al.*, 2016).

El control de la enfermedad se basa en el tratamiento antimicrobiano y las medidas sanitarias aplicadas en las granjas afectadas (Varela *et al.*, 2013). Entre los antimicrobianos más eficaces para su control, se recomiendan el grupo de los beta-lactámicos (Vela *et al.*, 2005; Varela *et al.*, 2013; El Garch *et al.*, 2016), aunque se han

detectado algunas cepas resistentes en los últimos años, (Varela *et al.*, 2013). Por otra parte, se han detectado diferentes niveles de resistencia a los macrólidos, tetraciclinas, sulfonamidas, aminoglucósidos y cloranfenicol. El porcentaje de cepas resistentes a macrólidos y tetraciclinas ha sido especialmente elevado (>70%) en aislamientos obtenidos de cerdos a partir de los años 80, así como en cepas humanas (Vela *et al.*, 2005; Wisselink *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008; Palmieri *et al.*, 2011).

Grenier y colaboradores (2009) señalaron la capacidad del *S. suis* de formar biopelículas y la capacidad de resistir la acción de los antibióticos en estos *biofilm*, necesitando períodos más largos de tratamiento, dosis más altas de los antimicrobianos para resolver las infecciones. Las biopelículas se definen como comunidades de microorganismos que se adhieren entre sí y a superficies sólidas y están encerrados en una matriz extracelular compuesta de materiales tanto de los microorganismos como del medio ambiente. La formación de biopelículas por microorganismos es un mecanismo que les permite convertirse en colonizadores persistentes, resistir la eliminación del sistema inmune del huésped, mejorar la resistencia a los antibióticos e intercambiar materiales genéticos (Donlan y Costerton, 2002).

El uso continuado e indiscriminado de antimicrobianos en la industria porcina ejerce una presión de crecimiento positiva sobre las cepas resistentes, que da lugar al fracaso terapéutico (Palmieri *et al.*, 2011; Varela *et al.*, 2013). La resistencia puede ser transferida por plásmidos o transposones y mediada por conjugación, transducción y transformación. Se ha demostrado que varios elementos responsables por la resistencia del *S. suis*, son similares a los que presentan otras especies de *Streptococcus* como *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*; *S. agalactiae*, compartiendo el mismo sitio de inserción en el cromosoma, lo que sugiere que *S. suis* podría ser un importante reservorio de resistencias antimicrobianas para patógenos humanos (Palmieri *et al.*, 2011; Varela *et al.*, 2013). Asimismo, el desarrollo de resistencias antimicrobianas en medicina veterinaria y el posible riesgo para la salud pública, obliga a centrarnos los esfuerzos en la prevención y búsqueda de alternativas antimicrobianas.

En la actualidad existe una importante presión para reducir el uso de antimicrobianos en todo el mundo (Ayrle *et al.*, 2016), hecho que ha provocado una situación alarmante, al no existir medicamentos disponibles para el tratamiento de algunas enfermedades, debido a la selección de bacterias multirresistentes y al escaso

desarrollo de nuevos productos por la industria farmacéutica. En tal escenario, la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017) señala que el estudio de nuevos antibióticos y el desarrollo de estrategias preventivas debe ser una prioridad, y se considera uno de los desafíos de salud más importantes en un futuro cercano.

Una de las estrategias propuestas para el control de estos patógenos es el diseño de nuevos agentes antimicrobianos, sintéticos o naturales, solos o combinados con antimicrobianos tradicionales que puedan actuar de forma sinérgica, reduciendo de esta forma la concentración de ambos productos (Gradinaru *et al.*, 2014, Magi *et al.*, 2015). Las bacteriocinas, péptidos antimicrobianos, bacteriófagos, y aceites esenciales pueden suponer una alternativa al tratamiento con antimicrobianos convencionales, y es una línea de trabajo muy interesante por desarrollar (Sfeir *et al.*, 2013, Freires *et al.*, 2015; Magi *et al.*, 2015, Ben Lagha *et al.*, 2017).

La aplicación de vacunas eficaces frente a *S. suis* constituye sin duda uno de los grandes retos de la investigación mundial (Li *et al.*, 2007; Fittipaldi *et al.*, 2008; Mandanici *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos hasta la fecha han sido bastante limitados debido, entre otros factores, a la gran ubicuidad y variabilidad detectada en los aislamientos (Tarradas *et al.*, 2001; King *et al.*, 2002; Vela *et al.*, 2003). Actualmente, para el control de los brotes clínicos se utilizan autovacunas que dan buenos resultados, pero no se puede asegurar su eficacia ante infecciones causadas por cepas de otros serotipos. Por ello, descubrir antígenos comunes a todos los serotipos, con gran capacidad inmunógena, supone un paso decisivo para conseguir elaborar vacunas comerciales (Baums *et al.*, 2009).

Búsqueda de nuevos antimicrobianos

Ante la necesidad de limitar el uso de antimicrobianos, la Asamblea Mundial de la Salud de mayo de 2015 adoptó un plan de acción sobre la resistencia a los antimicrobianos en el que se establecían seis líneas estratégicas para medicina humana y sanidad animal, incluido el desarrollo de antimicrobianos con un valor añadido frente a los ya comercializados (OMS, 2015).

En los días actuales, la búsqueda de nuevas moléculas ocurre por modificación o diseño de moléculas a partir del conocimiento existente, investigaciones aleatorias de

plantas o moléculas orgánicas con posibilidades terapéuticas, biotecnología o clonación genética. El nuevo medicamento debe presentar un potencial terapéutico adecuado con mínimos efectos adversos, por lo que muchas de las sustancias estudiadas no alcanzan finalmente la categoría de fármaco (García *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2013).

Una vez seleccionada la sustancia, su estudio incluirá las siguientes fases (Cantón *et al.*, 2013):

1. *Caracterización físico-química*: consiste en determinar las propiedades físicas del fármaco (punto de ebullición, comportamiento termodinámico, evaporación, solubilidad, etc.). La caracterización química describe aspectos como la estructura química (ácidos, alcoholes, éteres, etc.), comportamiento iónico, especificaciones iniciales, impurezas presentes, etc.
2. *Caracterización farmacológica*: consiste en investigar y verificar la actividad farmacológica del medicamento mediante estudios *in vitro*, en cultivos celulares y animales de experimentación. Se suelen iniciar, asimismo, los estudios de farmacodinámica (PD), farmacocinética (PK) y toxicidad.
3. *Pre-formulación*: diseño de la composición y forma de aplicación del fármaco que le confieren mayor estabilidad, seguridad y eficacia (Blasco *et al.*, 2015).
4. *Ensayos clínicos in vivo*: su objetivo es determinar la actividad biológica, toxicidad, efectos adversos, farmacocinética (absorción, bio-disponibilidad, distribución, metabolismo y excreción), farmacodinámica (mecanismos de acción y efecto sobre el organismo), relación dosis-respuesta y eficacia del fármaco en individuos sanos y enfermos (Idoate y Idoipe, 2002).

En el caso de los antimicrobianos, los estudios *in vitro* están basados en diferentes parámetros y métodos que ponen de manifiesto la actividad del nuevo producto frente a una especie bacteriana determinada, e incluyen:

- *Zona de inhibición en agar*: un gradiente de concentración del antimicrobiano en agar sumado a la sensibilidad del microorganismo forma una zona de inhibición del crecimiento alrededor de la fuente de antimicrobiano. El método estandarizado para hallar este parámetro es el test de difusión por disco, que involucra el uso de una cantidad constante de antibiótico en un disco de papel aplicado sobre la superficie

del agar en el cual se ha cultivado el microorganismo. El diámetro del halo resultante (en milímetro) es confrontado con los puntos de corte establecidos por los comités de referencia para el método de discos (García *et al.*, 2000; CLSI, 2015; EUCAST, 2000).

- *Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)*: Es posiblemente la medida más utilizada para estudiar la susceptibilidad bacteriana. Se define como la menor concentración de antimicrobiano que previene el crecimiento visible del inóculo bacteriano tras un tiempo de incubación (García *et al.*, 2000; Grau *et al.*, 2005). Es independiente para cada antibiótico y bacteria y permite determinar su sensibilidad o resistencia en base a puntos de cortes estandarizados. El valor de CMI puede ser hallado mediante técnicas de macro y micro dilución en caldo, difusión en agar (E-test) y dilución en agar (CLSI, 2015).
- *CMI₅₀ y CMI₉₀*: Se establecen a partir de estudios de distribución de la susceptibilidad en la población bacteriana y se definen como la menor concentración de producto capaz de inhibir el crecimiento del 50% y del 90% de las cepas (MacGowan y Wise, FAO, 2004; 2001CLSI, 2009). La CMI₉₀ se toma como referencia para determinar, junto a los modelos de PK/PD y los resultados clínicos, los puntos de corte de sensibilidad/resistencia. Este valor sirve, además, como guía para establecer la concentración de antimicrobiano que es preciso alcanzar en el lugar de la infección (Griffin *et al.*, 2000; Grau *et al.*, 2005; Becerril *et al.*, 2012).
- *Concentración Mínima Bactericida (CMB)*: Definida como la menor concentración de antimicrobiano que reduce en un 99,9% el inóculo inicial de células viables (García *et al.*, 2000; Grau *et al.*, 2005).
- *Potencial Microcida*: Determinado en base al índice CMB/CMI, es uno de los parámetros que permite caracterizar a los antimicrobianos como bactericidas (índice < 4) o bacteriostático (índice ≥ 4) (Montravers y Dupont, 1996; Schwarz *et al.*, 2010; Radhakrishnan *et al.*, 2011). Este potencial es importante a la hora de elegir la terapia adecuada, especialmente en animales inmunodeprimidos cuya capacidad para eliminar el microorganismo está disminuida (Silveira *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2013).

- *Concentración de Prevención de Mutantes (CPM)*: definida como la concentración mínima de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento tanto de las cepas susceptibles como de las cepas resistentes por mutaciones de primer paso, que estarían presentes en infecciones con alta densidad bacteriana (inóculo bacteriano $\geq 10^9$ UFC) (Balaje *et al.*, 2013; Dahiya *et al.*, 2014; Nordqvist *et al.*, 2016). A partir de la CMI y CPM se puede evaluar la ventana de selección de mutantes, que comprende el intervalo de concentraciones entre estos dos parámetros, a las cuales se inhibiría el crecimiento de las subpoblaciones sensibles y se favorecería el crecimiento selectivo de las cepas mutantes resistentes (Drlica, 2003).
- *Cinética de muerte o curva de letalidad*: permite determinar el poder bactericida en el tiempo de diferentes concentraciones de un antimicrobiano o una combinación de AMBs. En este sentido es complementaria de la CMB y permite valorar si un producto tiene efecto concentración-dependiente (si conforme aumenta su concentración por encima de la CMI se produce una mayor eliminación del microorganismo) o tiempo-dependiente (si la actividad bactericida de las concentraciones supra-inhibitorias es similar y la eliminación depende fundamentalmente de la duración de la exposición) (Figura 2). La curva de letalidad una técnica muy laboriosa y, en general de baja reproducibilidad ya que existen numerosos factores técnicos y metodológicos (inóculo, fase de crecimiento, tipo de tubo, modo de incubación, agitación) que afectan el resultado. De esta forma, se recomienda realizar como mínimo dos pruebas en días diferentes y expresar la media de los ensayos en un gráfico de escala semilogarítmica (\log_{10} del recuento en el eje de las ordenadas y el tiempo en escala aritmética de las abscisas) (CLSI, 1999; García *et al.*, 2000; Vázquez-Aguilar *et al.*, 2013).
- *Estudio de la combinación de antimicrobianos*: mediante técnicas *in vitro*, como el Checkerboard (tablero de ajedrez) se valora el posible efecto sinérgico de diversas concentraciones de antimicrobianos, que permita expandir el espectro de acción, minimizar la toxicidad de los fármacos, disminuir la aparición de resistencias bacterianas y controlar infecciones múltiples o causadas por microorganismos multirresistentes (García *et al.*, 2000; Langeveld *et al.*, 2013).

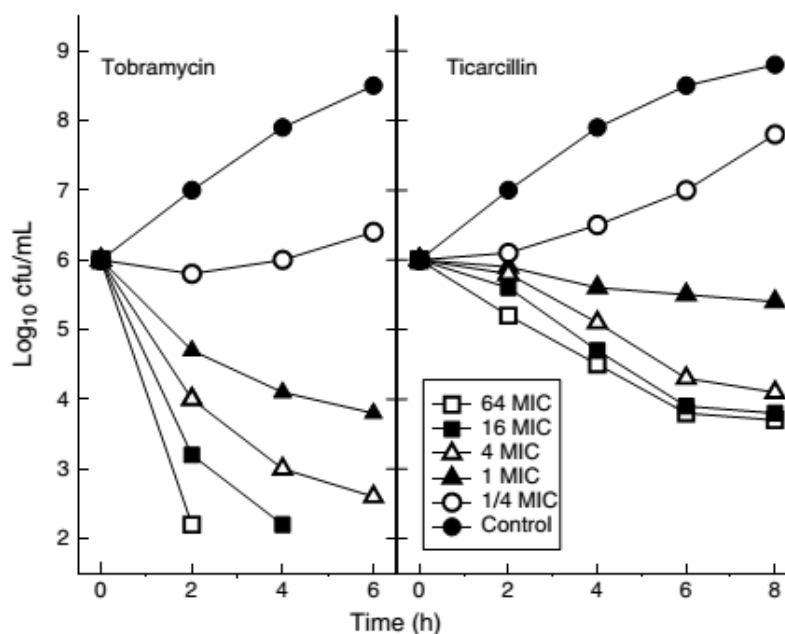


Figura 2. Curva de letalidad de *P. aeruginosa* ATCC 27853 frente a un antibiótico concentración-dependiente (Tobramicina), hay aumento de muerte bacteriana con el incremento de la concentración del antimicrobiano, y a uno tiempo-dependiente (Ticarcilina), la actividad depende de la duración de la exposición y no hay aumento de letalidad a dosis más altas (fuente: Vinks *et al.*, 2014).

- *Efecto post-antibiótico (EPA)*: se refiere a la supresión del crecimiento bacteriano que persiste tras una corta exposición a un antimicrobiano. Hace referencia a la capacidad del antimicrobiano de suprimir el crecimiento de la bacteria una vez su concentración sérica cae por debajo de la CMI y su aplicación más importante es la posibilidad de espaciar las dosis, reduciendo consecuentemente los efectos secundarios y los costes de la terapia (Canut-Blasco *et al.*, 2016). El término también se puede aplicar en los estudios *in vivo* a cambios morfológicos o bioquímicos.

Aceites esenciales

Desde la Antigüedad se han utilizado los productos derivados de plantas y especias de forma empírica por sus propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas e inmunoestimulantes (Shaaban *et al.*, 2012). Las plantas aromáticas, de las cuales existen más de 17500 especies, proporcionan una gran variedad de compuestos complejos y estructuralmente diversos, constituyendo uno de las principales fuentes de nuevas biomoléculas (Balouiri, 2015). Muchos de estos productos están autorizados para su uso como aditivos alimentarios en sanidad animal y la industria alimentaria (EC, 2003), y en

las últimas décadas se han multiplicado las investigaciones sobre su actividad antimicrobiana como una posible alternativa a los desinfectantes y antibióticos tradicionales.

Los AEs son una mezcla de sustancias químicas biosintetizadas por las plantas aromáticas como parte de su metabolismo secundario. Tras su producción, pueden almacenarse en distintas partes de la planta (flores, hojas, semillas, corteza, frutos y raíces) y se extraen por destilación en corriente de vapor o por expresión del material vegetal (Burt, 2004). Se considera que no están directamente implicados en el crecimiento, desarrollo o reproducción normal de la planta, sino que suelen estar involucrados en su defensa y por lo tanto pueden poseer propiedades antimicrobianas (Tajkarimi *et al.*, 2010).

Los AE son productos muy volátiles, ligeros, no grasos, poco solubles en agua y solubles en alcohol, grasas y aceites vegetales (Mith *et al.*, 2014). En su composición se pueden diferenciar entre 20 y 60 componentes diferentes, de los cuales dos o tres son mayoritarios (>70-80%) y el resto están presentes en trazas. Habitualmente, los componentes principales son los que determinan sus propiedades biológicas, si bien se considera que las sustancias presentes en trazas tienen un papel crítico en su actividad antimicrobiana, debido posiblemente a un efecto sinérgico (Bakkali *et al.*, 2008; Pavela, 2015). La proporción de cada sustancia puede variar en un mismo aceite en función de las estaciones, el origen geográfico, la variedad botánica, la genética de la planta o el método de extracción, determinando sus diferentes quimiotipos. Esta variación en la composición química puede implicar, además, diferencias en sus propiedades farmacológicas y aplicaciones médicas (Peñalver *et al.*, 2005).

Componentes principales de los AEs

Dentro de los componentes principales de los AE podemos distinguir dos grupos con diferente origen biosintético: los hidrocarburos terpénicos (terpenos y terpenoides) y los compuestos aromáticos y alifáticos, todos caracterizados por su bajo peso molecular (Figura 3) (Pichersky *et al.*, 2006; Bakkali *et al.*, 2008; Jakhelia *et al.*, 2010).

Los terpenos incluyen diversas clases, estructural y funcionalmente diferentes., cuya biosíntesis consiste en la adición repetitiva del precursor difosfato de isopentenilo (IPP) para formar el esqueleto de terpeno, seguida de una modificación enzimática secundaria

(reacción redox) que atribuí las propiedades funcionales a los diferentes terpenos. Los terpenos principales son los monoterpenos (C_{10}) y sesquiterpenos (C_{15}) (Bakkali *et al.*, 2008). Un terpeno que contiene oxígeno se llama terpenoide.

Los monoterpenos se forman a partir del acoplamiento de dos unidades de isopreno, y son las moléculas más representativas que constituyen el 90% de los AEs y permiten una gran variedad de estructuras (Shaaban *et al.*, 2012).

Entre los principales terpenos podemos destacar:

- Timol (fenol): principal componente de AE de tomillo;
- Carvacrol (fenol): isómero del timol y componente del AE de orégano y tomillo;
- Geraniol (fenol): tomillo vulgar;
- Linalool: que contiene un grupo alcohol en su estructura, presentes en el aceite de canela, tomillo rojo y tomillo vulgar;
- *p*-Cimeno (alquilbenceno): aceite de tomillo rojo;
- β -Cariofileno, posee un anillo ciclobutano y es constituyente del AE de clavo;
- γ -Terpineno: isómeros de hidrocarburos pertenecientes a los terpenos componentes de los AE de tomillo rojo y orégano;
- *d-l* Limoneno: terpeno hidrocarburo constituyente activo del AE de tomillo común.

Por su parte, los compuestos aromáticos son derivados del fenilpropano. Entre los más comunes se encuentran:

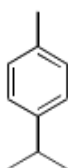
- Cinamaldehído: compuesto de un grupo fenilo enlazado a un aldehído y principal activo del AE de canela;
- Eugenol (fenol): principal componente del AE de clavo también presente en la canela;
- Eugenil acetato (fenol), componente del AE de clavo

1. Terpenes

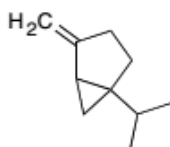
-Monoterpenes

Carbure monocyclic

Cymene ("y") or p.cymene

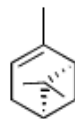


Sabinene

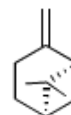


Carbure bicyclic

Alpha-pinene

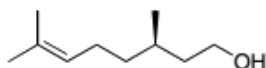


Betapinene

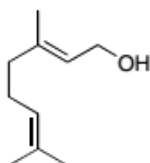


Alcohol acyclic

Citronellol

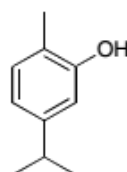


Geraniol

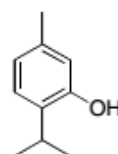


Phenol

Carvacrol



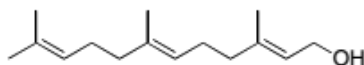
Thymol



-Sesquiterpenes

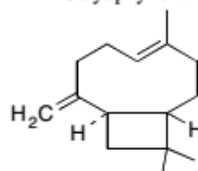
Carbure

Farnesol



Alcohol

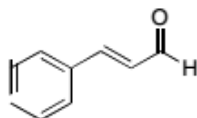
Caryophyllene



2. Aromatic compounds

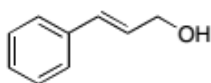
Aldehyde

Cinnamaldehyde



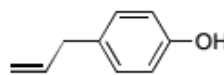
Alcohol

Cinnamyl alcohol



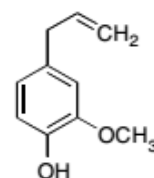
Phenol

Chavicol



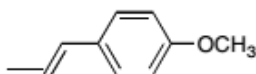
Phenol

Eugenol



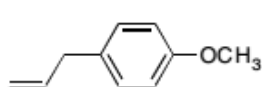
Methoxy derivative

Anethole



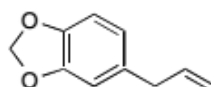
Methoxy derivative

Estragole



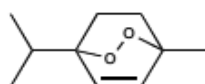
Methylene dioxy compound

Safrole



3. Terpenoides (Isoprenoides)

Ascaridole



Menthol

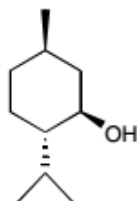


Figura 3. Principales grupos de componentes de los aceites esenciales (Bakkali *et al.*, 2008).

Las vías de síntesis de los terpenos y los derivados del fenilpropano son diferentes y en general no coexisten en la misma planta, si bien en ocasiones pueden darse a la vez y, dependiendo de la vía que asume el control, se determinan los componentes principales. La vía más frecuente en las plantas aromáticas suele ser la terpenoide, sin embargo, existen aceites como la canela cuyo componente mayoritario es un compuesto aromático (cinamaldehído) (Bakkali *et al.*, 2008).

Mecanismos de acción antimicrobiana

Los aceites esenciales son productos vegetales naturales que contienen una mezcla compleja de componentes y, por lo tanto, tienen múltiples propiedades.

Existe cierta controversia sobre el origen del potencial antimicrobiano de los AEs. Para algunos autores su actividad derivaría fundamentalmente de los terpenoides fenólicos, fenilpropanoides y alcoholes, en base a la mayor susceptibilidad mostrada por algunas bacterias para estos principios activos (Freires *et al.*, 2015). Sin embargo, otras investigaciones describen mayor potencial antimicrobiano para el AE completo debido a su compleja composición química y al posible sinergismo entre sus moléculas, muchas de ellas presentes en traza y/o con baja actividad antimicrobiana. Los factores que determinan la actividad de los AEs son la composición, los grupos funcionales presentes en los componentes activos y sus interacciones sinérgicas, así como la distribución del AE en la célula bacteriana, lo que determina el tipo de reacción y respuesta biológica (Rota *et al.*, 2004; Van-Vuuren y Viljoen, 2011; Bassole y Juliani, 2012; Ait-Said *et al.*, 2015). Este hecho ha sido sugerido por diversos autores como una ventaja frente a la inactivación y desarrollo de resistencias bacterianas (Knezevic *et al.* 2016).

La hidrofobicidad, típica de los AE, es responsable de la disrupción de las membranas celulares que conduce a una mayor permeabilidad (O'Bryan *et al.*, 2015). Como consecuencia tiene lugar una fuga de contenidos intracelulares vitales como electrolitos (potasio/hidrógeno), proteínas, azúcares reductores, ATP y ADN, mientras se inhibe la generación de energía (ATP) y las enzimas relacionadas (*ATPasa*), conllevando la destrucción celular (Nazzaro *et al.*, 2013; Chouhan *et al.*, 2017). Por otra parte, algunos componentes de los AE pueden inhibir los sistemas enzimáticos de la bacteria, alterando la división celular y ejerciendo diversos efectos sobre la producción de metabolitos (Lv *et al.*, 2011). Por ejemplo, la exposición de enterobacterias al

cinamaldehído puede incrementar la producción de indol y disulfuro de dimetilo (Shaaban *et al.*, 2012; Hossain *et al.*, 2013). El daño a las proteínas de membrana y la coagulación del citoplasma son también efectos comunes (Gill y Holley, 2006; Langeveld *et al.*, 2014).

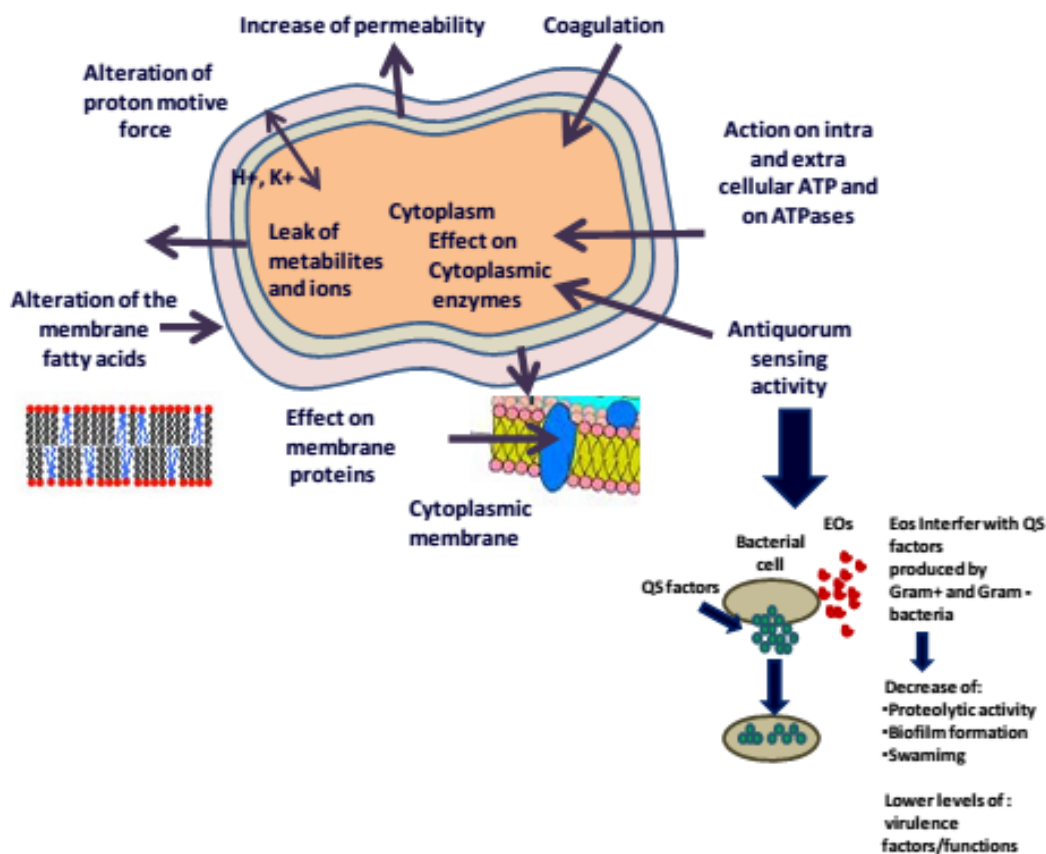


Figura 4. Mecanismo de acción y sitios diana de los aceites esenciales en las células microbianas (fuente: Nazzaro *et al.*, 2013)

Generalmente, los aceites esenciales que poseen notables propiedades antimicrobianas contienen un alto porcentaje de compuestos fenólicos como carvacrol y timol. Su mecanismo de acción es similar al de otros fenoles, es decir, alteran la membrana citoplasma, el flujo de electrones, el transporte activo y provocando la coagulación de contenidos celulares (Gutiérrez, 2006; Belato *et al.*, 2018). Para ello, estos fitocompuestos se insertan en la membrana citoplásmica, cambian sus propiedades físico-químicas y afectan a la estabilidad de la bicapa lipídica (Xu *et al.*, 2008). El grupo hidroxilo (OH), presente en el carvacrol y el timol, juega un importante papel en la despolarización del potencial de la membrana, actuando como un portador transmembrana de cationes monovalentes, responsable del desarrollo celular (Arfa *et*

al., 2006). Así, otros terpenos no fenólicos, como el cimenó, precisan concentraciones más altas para disminuir el potencial de la membrana (Ultee *et al.*, 2002; Belato *et al.*, 2018).

En la siguiente tabla se resume los mecanismos de acción de los principales componentes de los AEs estudiados en esta tesis.

Tabla 1. Principales mecanismos de acción de los componentes activos estudiados en esta tesis.

Componente	Mecanismo de acción	Referencias
Carvacrol	Interrupción de la membrana, inhibición de la actividad <i>ATPasa</i> , membrana	Ultee <i>et al.</i> , 2002; Gill & Holley, 2006; Di Pasqua <i>et al.</i> , 2007
	Desestabilización, fuga de iones celulares, fluidización de la membrana	
	Lípidos, reducción de la fuerza motriz del protón	
Timol	Interrupción de la membrana con objetivos intracelulares potenciales, alteración de la vía metabólica del citrato	Trombetta <i>et al.</i> , 2005; Di Pasqua <i>et al.</i> , 2007
Cinnamaldehído	Interrupción de la membrana mediante la inhibición de la actividad <i>ATPasa</i>	Gill y Holley, 2004, 2006

Fuente: Langeveld *et al.*, 2014.

Actividad antimicrobiana

La mayoría de estudios desarrollados en las últimas décadas sobre las propiedades antimicrobianas de los AE se han basado en la determinación de la CMI y, en menor medida, de la CMB y la curva de letalidad (Bakkali *et al.*, 2008; Bajpai *et al.*, 2012; Padalia *et al.*, 2015). Sin embargo, y a diferencia de los antibióticos, resulta bastante difícil la comparación entre estudios como consecuencia de los diferentes métodos de ensayo empleados y la, anteriormente mencionada, variación de los fitoconstituyentes de un mismo aceite (Ross *et al.*, 2001; Peinado-Guevara *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013). En general, los autores suelen tomar como referencia las técnicas descritas por el CLSI para las pruebas de susceptibilidad con bacterias de origen animal, siendo la dilución en caldo el método más utilizado, si bien es posible encontrar en la bibliografía notables variaciones en las condiciones de ensayo. Debido al carácter

hidrófobo de los aceites esenciales la reproducibilidad de este método es sólo adecuada (Gutiérrez *et al.*, 2006), siendo preciso realizar dos o más pruebas y ensayos.

No obstante, debemos recordar que existen numerosos factores técnicos y biológicos que pueden influir en la evaluación del potencial de un antimicrobiano y crean ciertas incertidumbres en la interpretación de su actividad. El efecto de la técnica (fase de crecimiento del inóculo, tamaño del inóculo, insuficiente contacto microorganismo/producto, volumen transferido, arrastre de producto) puede ser minimizado siguiendo las recomendaciones para los métodos estándar (CLSI, 1999; Balouiri *et al.*, 2015). Sin embargo, los factores biológicos (tolerancia, persistencia y resistencia) son característicos del efecto del fármaco en el microorganismo y deben ser considerados a la hora de interpretar los resultados.

Las investigaciones realizadas con aceites esenciales se han centrado fundamentalmente en microorganismos patógenos para el hombre y bacterias implicadas en toxiinfecciones alimentarias, describiendo notables diferencias según la especie bacteriana (Rota *et al.* 2004; Hammer *et al.*, 2012; Nazzaro *et al.*, 2013). Sin embargo, la mayoría de los trabajos se han limitado al estudio de cepas de referencia o un reducido número de cepas de campo, utilizando la media como estimador, por lo que existen pocos datos y de escasa precisión sobre la CMI₉₀ y la CMB₉₀ de los AEs (Silva *et al.*, 2013; Fratini *et al.*, 2014; Huerta *et al.*, 2016).

Los aceites esenciales han mostrado una notable actividad en los estudios *in vitro* frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas de interés en humana y medicina veterinaria como *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* de origen humano, como *S. mutans*, *S. pyogenes* y *S. salivarius* (Galvão *et al.*, 2012; Sfeir *et al.*, 2013; Freires *et al.*, 2015). Es sabido que, en comparación con las bacterias Gram negativas, las bacterias Gram positivas son más susceptibles a los AEs (Padalia *et al.*, 2015; Chouhan *et al.*, 2017). Esto se puede atribuir al hecho de que las bacterias Gram negativas tienen una membrana externa rígida, rica en lipopolisacárido (LPS) y más compleja, lo que limita la difusión de los compuestos hidrófobos a través de ella. Además, las bacterias Gram positivas pueden facilitar la infiltración de estos compuestos hidrófobos debido a los extremos lipofílicos del ácido lipoteicoico presente en su membrana celular (Chouhan *et al.*, 2017). Estudios realizados por nuestro grupo de investigación han demostrado el potencial de la

actividad de los AEs de canela, clavo, orégano y tomillos, frente a *Salmonella* Typhimurium, *S. Enteritidis*, aisladas en diversas especies animales, señalando variaciones en la susceptibilidad en función del serotipo y cepa (Solarte *et al.*, 2018).

La mayoría de estudios con *Streptococcus* spp. son de especies implicadas en patologías orales, respiratorias y cutáneas del hombre, con notables diferencias en los resultados dependiendo del aceite estudiado (Fabio *et al.*, 2007; Galvão *et al.*, 2012; Sfeir *et al.*, 2013; Freires *et al.*, 2015). Algunos trabajos con *S. suis*, destacaron la capacidad inhibitoria del AE de Chan (*Hyptis suaveolens*) y de albahaca (*Ocimum basilicum*), sin embargo, estos estudios se limitaron a un número muy reducido de cepas y emplearon exclusivamente los métodos de dilución en agar y difusión por disco (Nantitanon *et al.*, 2007; Rojas *et al.*, 2012).

Actividad antimicrobiana volátil

Estudios recientes han demostrado que *S. suis* es capaz de inducir la producción de *biofilms* y que estas bacterias son más resistentes, poseen períodos más largos de terapia y dosis más altas de antibióticos (Grenier *et al.*, 2009). En la granja, la formación de *biofilms* constituye una vía importante para la contaminación cruzada y la reinfección, por lo tanto, un tratamiento que sea eficaz en la eliminación y prevención de *biofilms* podría proporcionar un método para reducir las infecciones por *S. suis* (Laird y Phillips, 2012).

Los aceites esenciales están compuestos de numerosos principios activos de naturaleza volátil con actividad antimicrobiana por contacto gaseoso (Inouye *et al.*, 2001). Esta característica ha sido referida por diversos autores como una ventaja para la utilización de los aceites esenciales en patologías respiratorias y desinfección de instalaciones, al prevenir la formación de *biofilms* (Laird y Phillips, 2012). En base a la actividad antimicrobiana demostrada por sus componentes volátiles, algunos AEs han sido capaces de reducir la formación de *biofilms* por *Staphylococcus aureus* y de eliminar la biopelícula una vez formada.

Se ha demostrado que la actividad antimicrobiana de los compuestos volátiles se debe al efecto combinado de la absorción directa del vapor por el microorganismo condicionada a su vez por la velocidad de evaporación, y al efecto indirecto a través del medio que absorbió el vapor. Esta absorción depende de la hidrofobicidad, volatilidad y

estabilidad del compuesto volátil en agar (Moleyar y Narasimham, 1986; Inouye *et al.*, 2001). El carvacrol y el timol (principales compuestos volátiles del orégano y el tomillo) alcanzan, por su estabilidad y solubilidad en agua, notables concentraciones en el medio tras su evaporación, por lo que su acción se desarrollaría fundamentalmente por contacto.

Factores biológicos

Otra cuestión importante con respecto a los AE, como posible producto terapéutico, es si su uso podría generar resistencia o tolerancia, al igual que los antibióticos.

La disminución o desaparición de la capacidad de matar de un agente bactericida para un determinado aislamiento e especie se denomina *tolerancia*. La bacteria es capaz de evitar su acción letal pero no hay cambio en el CMI. De esta forma, los aislamientos tolerantes, independientemente de cuál sea el mecanismo responsable, exhiben CMB inusualmente altas en relación con sus CMI ($\text{CMB/CMI} \geq 32$). Sin embargo, tal relación no permite distinguir la tolerancia fenotípica de la tolerancia genética. La tolerancia fenotípica es una propiedad de prácticamente todas las cepas de bacterias y se define como una menor susceptibilidad a los agentes antimicrobianos que se manifiesta solo bajo ciertas condiciones de crecimiento. En un estudio de curva de letalidad, un aislado fenotípicamente tolerante demuestra una tasa inicial alta de muerte similar a la de un aislado no tolerante, pero luego alcanza una tasa de supervivencia más alta ($> 0.1\%$), mientras que la tolerancia genética se caracteriza por una lenta pérdida de viabilidad durante las primeras 24 horas. Hay estudios que sugieren la posible importancia clínica de los aislados tolerantes que puede determinar en algunas infecciones la necesidad de asociar este antimicrobiano con uno bacteriostático (CLSI, 1999; EUCAST, 2000).

La *persistencia* bacteriana es una expresión fenotípica y no heredable de una pequeña subpoblación que se origina de manera espontánea o inducida por factores de estrés medioambiental, entre los que se halla la exposición a elevadas concentraciones de antimicrobianos. Suelen ser menos del 0,1% del inóculo final del inóculo y por esto, la definición de CMB se refiere a la muerte del 99,9% del inóculo. Aparece sobre todo con β -lactámicos. Se considera que estas bacterias son capaces de escapar a la acción letal de los agentes bactericidas porque sus sitios de acción estarían inactivados gracias

a una disminución de su actividad metabólica. Por lo tanto, cuanto más lenta es la tasa de crecimiento bacteriano, más lento es el efecto bactericida del antibiótico. Sin embargo, estas bacterias son capaces de replicarse y manifiestan una sobreexpresión y aumento de la actividad de las bombas de eflujo, que reduce de manera significativa las concentraciones de los antibióticos en el interior de la bacteria. De esta forma, dependiendo de la velocidad de eliminación y replicación bacteriana, en la curva podremos observar un enlentecimiento en la tasa de muerte o incluso un recrecimiento de la población bacteriana persistente (Lewis, 2007; Dörr *et al.*, 2009; Pu *et al.*, 2016).

Es posible que los microorganismos desarrollen resistencia durante la realización real de una prueba de susceptibilidad. Esta es una *resistencia fenotípica* que es una característica inherente del microorganismo. Las pruebas de actividad bactericida son particularmente propensas a seleccionar cepas resistentes fenotípicamente. A diferencia de los microorganismos persistentes, estos sobrevivientes manifestarán un aumento de la CMI cuando vuelvan a someterse a prueba. El desarrollo de estas subpoblaciones fenotípicamente resistentes se ha demostrado *in vivo* y es clínicamente importante (CLSI, 1999)

Los primeros estudios realizados por Papadopoulos y *cols.* (2008) con el AE de árbol del té y sus principales componentes (terpinen-4-ol, 1,8-cineol y -terpineol) demostraron la implicación de la bomba de eflujo (MexAB-OprM) de *Pseudomonas aeruginosa* en la eliminación del AE del interior de la célula, con la consiguiente disminución de la susceptibilidad de las cepas.

Trabajos posteriores de inducción de cepas mutantes para valorar posible resistencia al orégano, canela y el carvacrol con diversas especies bacterianas (incluida *S. pyogenes*), no encontraron alteraciones significativas en la susceptibilidad de las bacterias estudiadas. (Becerril *et al.*, 2012; Magi *et al.*, 2015; Solarte 2017). Por otro lado, los estudios de Luz y *cols.* (2014) han mostrado alteraciones subletales en la membrana citoplasmática y externa, con una disminución en la cantidad de ácidos grasos saturados, tras la exposición durante 24 h de *Salmonella* Typhimurium a concentraciones subletales del aceite de orégano. Estas alteraciones, descritas por otros autores como una respuesta adaptativa de las bacterias a un estrés subletal con el fin de mantener su integridad y funcionalidad (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2008; Patrignani *et al.*,

2008), no conllevaron sin embargo una reducción significativa en la susceptibilidad bacteriana (Hammer *et al.*, 2012).

La reducida resistencia bacteriana descrita hacia los AE podría deberse al hecho de que éstos no atacan un solo objetivo específico, dado que sus diferentes componentes químicos pueden desarrollar múltiples mecanismos de acción (Becerril *et al.*, 2012; Nazzaro *et al.*, 2013; Yap *et al.*, 2014). Considerando solamente la desestabilización que provocan los AE sobre las membranas celulares, puede ser simplemente difícil desarrollar un mecanismo de resistencia que proteja una diana tan grande (Langeveld *et al.*, 2014).

Combinación con antimicrobianos tradicionales

Una vez demostradas las propiedades antimicrobianas de los AE, las investigaciones se han centrado en la posibilidad de utilizarlos combinados con los AMB a fin de aumentar o restablecer su eficacia contra las bacterias multirresistentes (Chouhan *et al.*, 2017). La combinación de antimicrobianos se ocupa en tres situaciones clínicas: para lograr sinergia antimicrobiana, para ampliar el espectro antimicrobiano o para prevenir la aparición de resistencia.

Los mecanismos que pueden conducir a la sinergia farmacológica son:

- Efecto multi-objetivo, en el que los compuestos se dirigen a diferentes sitios en la célula bacteriana;
- Acción conjunta sobre un mecanismo de resistencia específico de las bacterias.
- Efectos farmacocinéticos o fisicoquímicos (mejora de la solubilidad o biodisponibilidad);

Los trabajos desarrollados han mostrado resultados muy diversos en función de la especie bacteriana y los productos utilizados. En general, los trabajos describen un aumento de la susceptibilidad bacteriana a los AMB al usarlos en combinados (Fadli *et al.*, 2011; Kon y Rai, 2012; Yap *et al.*, 2014). Los mecanismos moleculares responsables de la sinergia entre antimicrobianos y productos naturales no son del todo conocidos. Estudios recientes han destacado el efecto de ciertos AEs sobre determinados mecanismos de resistencia de las bacterias frente a los AMB tradicionales,

como las bombas de expulsión activa, revelando su potencial en un espectro más amplio contra organismos múltiples resistentes a fármacos (Chovanová *et al.*, 2015).

Diferencias relativamente pequeñas en la estructura química entre los componentes de la AEs pueden tener efectos significativos en la capacidad de sinergia con los antibióticos, lo que podría proporcionar alguna información sobre el modo de acción también de los AEs. Por ejemplo, carvacrol y timol son estructuralmente similares, diferenciándose solo en la ubicación del grupo hidroxilo. Sin embargo, carvacrol presentó mejores resultados sinérgicos en combinación con antibióticos, mientras que el timol fue sólo indiferente (Zhang *et al.*, 2011; Langeveld *et al.*, 2014). El cinamaldehído, que contiene un grupo lateral prop-2-enal al anillo de benceno, fue sinérgico con menos antibióticos que los fenoles carvacrol y timol (Palaniappan y Holley, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Langeveld *et al.*, 2014).

Dentro de los estudios de interacción, encontramos diversos trabajos para valorar el posible desarrollo de tolerancia cruzada a los AMB tradicionales tras la exposición continuada a dosis subletales de AE o sus principios activos. Los trabajos de Monte y cols. (2014) mostraron valores similares o ligeramente inferiores para la CMI de la ciprofloxacina en las bacterias expuestas a dosis sub-CMI de AE de orégano durante 72h con respecto a las bacterias no expuestas, lo que indica que la exposición al orégano no disminuyó la susceptibilidad de las cepas a la ciprofloxacina. Por su parte, en los trabajos de Kollanoor-Johny y cols. (2010) la exposición a dosis sub-CMI de cinamaldehído aumentó la sensibilidad de *S. Typhimurium* a la ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfametoxazol y tetraciclina; a su vez el timol aumentó la susceptibilidad de la bacteria a todos estos antibióticos excepto la ampicilina, mientras que carvacrol disminuyó la CMI de la bacteria al cloranfenicol, sulfametoxazol y tetraciclina y el eugenol hizo lo mismo para el cloranfenicol y sulfametoxazol.

Toxicidad

La existencia de plantas con un elevado potencial terapéutico constituye una alternativa farmacológica de marcado interés en el tratamiento de muchas enfermedades, de ahí la importancia de realizar estudios *in vitro* e *in vivo* con el propósito de detectar posibles efectos tóxicos tras su administración (Belato *et al.*, 2007).

Los estudios de Fabio y cols. (2007) en línea celular Vero mostraron que la canela, el tomillo y el orégano a concentraciones superiores a 50 µg/ml, 200 y 500 µg/ml, respectivamente, pueden ocasionar un aumento de la necrosis y la apoptosis celular. Valores equivalentes a los encontrados por Dušan y cols. (2006) para estos aceites en estudio con células Caco-2. En el caso de los principios activos, el timol presentó reducción abajo del 50% en la viabilidad de macrófagos murino (RAW 264.7) a concentraciones de 10-160 µg/ml, sin efecto genotóxico (Belato *et al.*, 2018). No obstante, la línea celular Vero y Caco-2 cuando expuestas al timol a concentraciones de 400 y 120 µg/ml, respectivamente, por 24 h, resultaron con aproximadamente 80 % de células viables (Dušan *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2017). En el caso del carvacrol, este indujo aumento significativo de la apoptosis o necrosis tras 24 horas de incubación a concentraciones de 34,55 y 55,6 µg/ml en células Caco-2, mientras que, a concentración de 275 µg/ml resultó en apoptosis o necrosis del 100% de la población (Dušan *et al.*, 2006; Llana-Ruiz-Cabello *et al.*, 2013). La línea celular Vero cuando expuesta al cinamaldehído, demostró pérdida de viabilidad en la mitad de la población a concentración de 125 µg/ml, sin embargo el cinamaldehído y el timol en combinación mostraron una viabilidad celular mejorada cuando comparad al cinamaldehído sólo (Sharma *et al.*, 2017). Se observó diferencia entre los trabajos en las concentraciones citotóxica para un mismo producto, hecho que puede deberse a la elección de la línea celular, el tiempo de exposición y diferencia entre los AEs (Dušan *et al.*, 2006; Llana-Ruiz-Cabello *et al.*, 2013).

Dentro de los estudios *in vivo* se encuentran las pruebas de toxicidad aguda a dosis única (imprescindibles en la estimación del potencial tóxico de una sustancia), basadas en el estudio cuali-cuantitativo de los fenómenos tóxicos y de su aparición en función del tiempo tras la administración de una dosis única o de varias dosis fraccionadas en el transcurso de 24 horas. (OCED, 2008). La mayoría de pruebas realizadas con AE o sus principios activos mayoritarios han mostrado una toxicidad aguda oral en ratas baja, con dosis letales 50 (DL50) inferiores a 2000 mg/kg, valor límite establecido por la OCED para los estudios de toxicidad. En el caso del carvacrol y timol, principales componentes de los AE de orégano y tomillo, la DL50 en ratas es de 1000 mg/kg y 980 mg/kg, respectivamente (EMA, 1996; Suntres *et al.*, 2015). De igual modo, los estudios de toxicidad subcrónica con AE de orégano, basados en la

administración oral durante 90 días de 50-200 mg/kg, no revelaron mortalidad ni efectos adversos (Llana-Ruiz-Cabello *et al.*, 2015).

Los AEs de canela y clavo ingeridos en dosis altas por vía oral pueden ocasionar cuadros de depresión generalizada en el SNC. Igualmente, se han descrito efectos de somnolencia con dosis elevadas de AE de orégano y efectos narcóticos y estupefacientes con el AE de tomillo, siendo el timol el compuesto fenólico responsable de dichos efectos (Lis-Balchin *et al.*, 1999; Madeira *et al.*, 2002). Muchos AEs pueden ser irritantes dérmicos y generar desde edemas, ampollas o vesículas, hasta lesiones cáusticas, lesiones cancerosas e hiperpigmentación de la piel (Artuz y Restrepo, 2002). Para minimizar este efecto, y dado que los AE son sustancias altamente concentradas, se suelen diluir para su utilización con un aceite portador (aceite de oliva) (Lahlou *et al.*, 2004). Otros efectos adversos descritos para algunos AE son: episodios convulsivos, hepato-toxicidad y daño renal cuando la absorción sistémica es alta (Sienkiewicz *et al.*, 2012; Bilia *et al.*, 2014).

Estudios in vivo

Por su condición de aditivos alimentarios, la mayoría de los estudios *in vivo* de los AE se han realizado con el fin de evaluar su efecto e influencia en parámetros productivos en animales de granja, principalmente en aves y cerdos (Đorđević *et al.*, 2015). Se ha observado que los AEs mejoran la conversión alimenticia y estimulan enzimas digestivas (Hernández *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2015). En pollos de engorde, Isabel y Santos (2009) destacaron ganancias de peso significativamente mayores en los animales alimentados con pienso suplementado con AE de clavo, mientras que los estudios de Betancourt y cols. (2012) con AE de orégano comprobaron una mejor digestibilidad de proteínas y grasas. Por otra parte, las pruebas clínicas y de campo realizadas con gallinas ponedoras infectadas con *Salmonella* Enteritidis a las que se les administró un preparado con aceite de clavo, mostraron una reducción en la infección experimental del 4% y la ausencia total de salmonelas en las heces de las gallinas alimentadas con este compuesto (Huerta *et al.*, 2005).

Los estudios *in vivo* en cerdos con orégano, tomillo y canela generalmente describen un aumento significativo en el rendimiento del crecimiento sin alterar la calidad de la canal, 30,31 que se asocia, en lechones, con un efecto beneficioso en la

digestibilidad de los nutrientes, su efecto regulador del metabolismo gastroentérico y a su actividad inmunoestimulante, antioxidante, antibacteriana y antiinflamatoria (Yan *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2015). Sin embargo, en algunos estudios con lechones destetados, el potencial de crecimiento de estos AEs fue menor que el de los agentes antimicrobianos (Neill *et al.*, 2006; Ragland *et al.*, 2007). Estudios similares sobre el efecto del AE de orégano en cerdas reproductoras mostraron menor mortalidad de las cerdas, reducción del sacrificio de cerdas durante la lactancia, mejores tasas de parición y un aumento del número de lechones por camada asociado y una menor tasa de mortinatos (Allan y Bilkey, 2005).

A pesar de su uso extendido en numerosas culturas y la diversidad de aplicaciones descritas para los AE, su aprobación como fármacos terapéuticos precisa de estudios *in vitro* e *in vivo* que demuestren su eficacia como antimicrobianos y mecanismos de acción, su efecto sobre la producción animal y su seguridad para la salud humana y medio ambiental (O'Bryan *et al.*, 2015).

Capítulo 3

Objetivos/Objectives

Objetivos

Primer objetivo

Estudio cualitativo del potencial antimicrobiano de ocho aceites esenciales, por contacto directo y gaseoso, mediante determinación del halo de inhibición frente a cepas de campo de *Streptococcus suis*. Selección de los aceites con mayor potencial para su estudio cuantitativo.

Segundo objetivo

Valorar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales seleccionados y sus principales componentes activos frente a cepas de *S. suis*, de origen humano y porcino, aisladas en animales portadores y casos clínicos.

Los objetivos específicos planteados para el desarrollo de este objetivo fueron:

- Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y mínima bactericida (CMB) y potencial microcida de los aceites esenciales de orégano, tomillo vulgar, tomillo rojo y canela y de sus principales componentes (cinamaldehído, carvacrol y timol).
- Estudio de la distribución de la sensibilidad bacteriana a los aceites esenciales y sus principales componentes: cálculo de la CMI_{50 y 90} y CMB_{50 y 90}.
- Determinación de la curva de letalidad de los distintos productos a fin de establecer la dinámica de su acción microcida y la relación concentración-tiempo-efecto

Tercer objetivo

Estudiar el efecto de la combinación de los aceites esenciales seleccionados y sus principales componentes con los antimicrobianos frecuentemente utilizados en el control de infecciones en el cerdo.

Objectives

First objective

Qualitative study of the antimicrobial potential of eight essential oils against field strains of *Streptococcus suis* by means of determination of inhibition halo after direct and gaseous contact. Selection of oils with greatest potential for quantitative study.

Second objective

To evaluate the antimicrobial activity of the selected essential oils and their main active components against strains of *S. suis*, of human and porcine origin, isolated from carrier animals and clinical cases:

- Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and microcidal potential of oregano, common thyme, red thyme, and cinnamon oils and their main components (thymol, carvacrol and cinnamaldehyde);
- Study of the distribution of bacterial susceptibility to essential oils and their main components: calculating of the MIC₅₀ and 90 and MBC₅₀ and 90;
- Determination of the time-kill curve of different products to establish the dynamics of their microcidal action and the concentration-time-effect relationship.

Third objective

To assess the effect of the combination of selected essential oils and their main active components with the conventional antimicrobials commonly used in the control of infections in pigs.

Capítulo 4

Material y Métodos generales

Material y Métodos generales

Aceites esenciales

En base a los estudios previos de nuestro grupo de investigación con bacterias Gram positivas y a los resultados publicados para otras especies de estreptococos (Freires *et al.*, 2015; Huerta *et al.*, 2016), se seleccionaron para el estudio cualitativo 8 aceites esenciales de origen natural, con una pureza $\geq 98\%$, proporcionados por un único fabricante (Aromium, Barcelona, España)

En la siguiente tabla se relacionan los aceites esenciales utilizados en este trabajo con sus principales componentes activos, nombre científico y nombre común.

Tabla 2. Descripción de los aceites esenciales utilizados en esta tesis.

Aceite esencial	Nombre común	Familia	Principales componentes
<i>Ocimum basilicum</i>	Albahaca	Lamiaceae	Estragol 83,34%, eucaliptol 3,34%, bergamoteno 2,58%, linalool 0,89%
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (corteza)	Canela	Lauraceae	Cinamaldehído 69,18%, linalool [3,19], eugenol [3,03]
<i>Eugenia caryophyllata</i>	Clavo	Myrtaceae	Eugenol 85%-90%, acetato de eugenol [5-10], caryophyllene [0-5]
<i>Mentha piperita</i>	Menta	Lamiaceae	Mentol [50-55], mentona [20-25], eucaliptol [5-10], acetato de metilo [5-10]
<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	Lamiaceae	Carvacrol [63,01], timol [10.,56], γ -terpineno [8,11]
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero	Lamiaceae	α -Pino + α -thuyene 22,75%, 1.8 cineol [20,63], alcanfor [18,78]
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomillo vulgar	Lamiaceae	Timol ^{NF} , p-cimeno ^{NF} , linalool ^{NF}
<i>Thymus zygis</i>	Tomillo rojo	Lamiaceae	Timol [46,9], p-cimeno [21,72], γ -terpineno [9,32], linalool [4,8]

Principios activos

Una vez conocidos los resultados del primer objetivo, se seleccionaron para el estudio cuantitativo y de sinergia los cuatro aceites con mayor potencial y se adquirieron preparados comerciales de sus principales componentes activos (cinamaldehído, carvacrol y timol) (Sigma Aldrich, España), con el fin de comparar su potencial antimicrobiano (Tabla 3).

Tabla 3. Descripción de los principios activos utilizados en esta tesis.

Producto	Referencia Sigma Aldrich	Nombre IUPAC	Pureza
Cinamaldehído	W228613	3-Phenylprop-2-enal	≥ 95%
Carvacrol	W224511	5-Isopropyl-2-methylphenol	99%
Timol	T0501	2-Isopropyl-5-methylphenol	≥ 98,5%

Cepas bacterianas

Para esta tesis se han utilizado un total de 60 cepas de *Streptococcus suis*, pertenecientes a 23 serotipos diferentes, 6 de ellas aisladas de casos clínicos de humana (Instituto de Salud Carlos III, Madrid) y 53 procedentes de casos clínicos y cerdos portadores atendidos en el Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Córdoba y el Instituto Central de Veterinaria de Wageningen (Lelystad, Holanda) entre 1999 y 2017. En el estudio se incluyó asimismo la cepa de referencia europea P1/7, amablemente cedida por el profesor Henk Wisselink (Instituto Central de Veterinaria de Wageningen). Los datos referentes a la identificación bacteriana, origen y cuadro clínico-lesional se detallan en la Tabla 5. Todos los aislamientos se conservaron hasta su utilización a -80 °C en criobolas (Criobank™, Londres-Reino Unido).

Como control de calidad, se incluyó en todos los ensayos la cepa de referencia *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, según recomienda el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015).

Test de susceptibilidades in vitro frente a antimicrobianos convencionales

Previamente al inicio de esta Tesis se determinó el perfil de resistencia antimicrobiana de las cepas utilizadas en este trabajo frente a diversos antimicrobianos

de uso común en medicina veterinaria (Sigma-Aldrich, Madrid), mediante estimación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en caldo.

Siguiendo el protocolo estandarizado por el CLSI (2013) para las pruebas de susceptibilidad *in vitro* con patógenos de origen animal, a partir de un cultivo puro (37°C, microaerofilia, 18-24h) de la cepa problema en agar sangre (Oxoid Ltd.), se obtuvo un inóculo bacteriano en solución salina estéril con 10^8 UFC/ml, utilizando un lector de placa microtiter iMark™ (BIO-RAD®) a 595 nm (D.O. 0,08-0,13 \approx 0,5 McFarland). A continuación, se diluyeron 100 μ l de inóculo en 9,9 ml de caldo Mueller-Hinton cationado y suplementado con un 5% de sangre hemolisada de caballo (MHS), de modo que la concentración final de la bacteria en el pocillo de ensayo fuese aproximadamente de 5×10^5 UFC/ml.

A partir de la solución stock (1024 μ g/ml), preparada según la norma para cada antimicrobiano, se realizaron diluciones dobles seriadas en caldo MH (Tabla 4) y se enfrentaron a un volumen igual de inóculo en placas microtiter de 96 pocillos (volumen final en pocillo 200 μ l). El ensayo fue realizado por duplicado, incluyendo en todos los casos un control de crecimiento negativo (caldo sin inóculo bacteriano) y crecimiento positivo (caldo con inóculo bacteriano sin antibiótico). Las placas se incubaron a 35 °C durante 20-24 horas en condiciones aeróbicas. La CMI fue determinada como la menor concentración de antimicrobiano que inhibió el crecimiento visible del inóculo bacteriano. La concentración final del inóculo se comprobó en todos los ensayos mediante una prueba de recuento en placa.

Tabla 4. Antimicrobianos, rango de concentraciones y puntos de corte utilizados.

Antimicrobiano*	Concentraciones finales	Puntos de corte (μ g/ml)		
	ensayadas (μ g/ml)	Sensible	Intermedia	Resistente
P	0,016 - 32,0	$\leq 0,25$	0,5	≥ 1
ENR	0,016 - 32,0	$\leq 0,5$	1	≥ 2
CEF	0,016 - 32,0	≤ 2	4	≥ 8
CN	0,25 - 512	≤ 4	8	≥ 16
OT	0,25 - 512	$\leq 0,5$	1	≥ 2
SXT	0,25/4,75 - 512/9728	$\leq 0,5/9,5$	1/19 - 2/38	$\geq 4/76$

* P: penicilina G, ENR: enrofloxacin; CEF: ceftiofur; CN: gentamicina; OT: oxitetraciclina; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol.

En la tabla 4 se detallan las diluciones de ensayo preparadas para cada antimicrobiano y los puntos de corte seguidos para clasificar las cepas como sensibles, intermedias o resistentes. En el caso de la gentamicina se utilizaron los puntos de corte establecidos por el CLSI para patógenos de origen animal (M31-A3, 2008); para tetraciclina, penicilina y enrofloxacin los puntos de corte descritos por el CLSI para *S. suis* y para trimetoprim-sulfametoxazol los puntos de corte para patógenos respiratorios humanos (*S. pneumoniae*) (VET01Sed3E, 2015). Los resultados obtenidos para la CMI y el perfil de resistencia se describen en el Anexo 1 y la tabla 5.

Tabla 5. Referencia, serotipo, órgano de aislamiento, cuadro patológico y perfil de resistencia de las cepas de *S. suis* utilizadas en esta tesis.

	Referencia	Serotipo	Forma clínica	Órgano	Perfil de resistencia
1	638/03	1	Artritis	Articulación	SXT; CN; OT
2	P1/7*	2	Meningitis	Cerebro	CN
3	235/02	2	Septicemia	Riñón	SXT; CN; OT
4	365/03	2	Meningitis	Cerebro	SXT; CN; OT
5	682/06	2	Septicemia	Hígado	CN; OT
6	123/11	2	Bronconeumonía	Articulación	SXT; CN; OT; P
7	93/05	2	Bronconeumonía	Pulmón	SXT; OT
8	203/05	2	Meningitis	Cerebro	OT
9	225/00	3	Artritis	Articulación	SXT; CN; OT
10	14/03	4	Septicemia	Riñón	CN; OT
11	636/03	4	Bronconeumonía	Pulmón	SXT; CN; OT
12	196/05	4	Septicemia	Bazo	SXT; OT
13	792/02	4	Bronconeumonía	Pulmón	CN; OT
14	633/99	5	Aborto	Feto	SXT; CN; OT; ENR
15	5215*	6	-	-	SXT; CN; OT; ENR
16	316/12	6	-	Nódulo linfático	OT
17	22/02	7	Septicemia	Pulmón	-
18	204/03	7	Meningitis	Cerebro	SXT; CN; OT
19	26/03	7	Meningitis	Cerebro	SXT; OT
20	40/03	8	Artritis	Articulación	CN; OT
21	160/03	8	Bronconeumonía	Pulmón	CN; OT
22	553/05	8	Septicemia	Hígado	CN; OT
23	3144	9	Meningitis	Cerebro	SXT; CN; OT; P
24	8010*	9	-	-	SXT; CN; OT
25	233/01	9	Artritis	Articulación	SXT; CN; OT
26	10/06	9	Meningitis	Cerebro	SXT; OT; ENR
27	228/06	9	Meningitis	Cerebro	CN; OT; CEF; P
28	34/11	9	Meningitis	Cerebro	SXT; CN; OT
29	746/02	9	Meningitis	Cerebelo	SXT; OT

Continuación Tabla 5.

	Referencia	Serotipo	Forma clínica	Órgano	Perfil de resistencia
30	340/05	10	Bronconeumonía	Pulmón	CEF
31	546/05	14	Meningitis	Cerebro	CN; OT
32	232/06	14	Artritis	Articulación	CN; OT
33	5225*	15	-	-	SXT; CN; OT
34	609/02	15	Bronconeumonía	Pulmón	SXT; OT; P
35	668/02	15	Meningitis	Cerebro	SXT; CN; OT
36	724/02	16	Septicemia	Riñón	OT
37	226/03	16	Meningitis	Cerebro	SXT; CN; OT; P
35	592/06	16	Meningitis	Cerebro	OT
39	261/12	16	Bronconeumonía	Pulmón	SXT; OT
40	20/17	16	Meningitis	Cerebro	SXT; CN; OT; P
41	36/12	20	Bronconeumonía	Pulmón	OT
42	574/02	20	Meningitis	Cerebro	OT
43	273/12	21	-	Hígado	SXT; P
44	341/12	22	Portador	Nódulo linfático	-
45	6217*	24	-	-	SXT; OT; P
46	338/12	24	Portador	Nódulo linfático	SXT; OT
47	6218*	25	-	-	OT
48	10/17	25	-	Corazón	ENR
49	269/12	26	-	Bazo	SXT; OT
50	6221*	28	-	-	SXT; OT; P
51	35/12	31	Portador	Nódulo linfático	-
52	635/03	1/2	Meningitis	Cerebro	SXT; OT
53	658/02	1/14	Meningitis	Cerebro	SXT; CN; OT
54	699/02	1/14	Meningitis	Cerebro	SXT; CN; OT
55	857/06	2	Meningitis	Líquido cefalorraquídeo	-
56	1299/06	2	Meningitis	Líquido cefalorraquídeo	OT
57	34/11 H	2	Meningitis	Líquido cefalorraquídeo	SXT
58	1086/11	2	Meningitis	Sangre	OT
59	117/12	2	Meningitis	Sangre	CN
60	41/14	2	Meningitis	Sangre	SXT; OT

* Cepas amablemente cedidas por el Prof. Henk Wisselink (Instituto Veterinario Central de Wageningen, Lelystad, Países Bajos). Cepas 1-54 fueron aisladas de cerdos portadores o enfermos, las cepas de 55-60 fueron aisladas de casos clínicos de humanos y concedidas por el Instituto de Salud Carlos III (Madrid, España). P, penicilina; ENR, enrofloxacin; CEF, ceftiofur; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; CN; gentamicina; OT oxitetraciclina.

Capítulo 4

Primer objetivo

“Estudio cualitativo del potencial antimicrobiano de ocho aceites esenciales, por contacto directo y gaseoso, mediante determinación del halo de inhibición frente a cepas de campo de *Streptococcus suis*. Selección de los aceites con mayor potencial para su estudio cuantitativo”.

Los AEs son sustancias con demostrada actividad bactericida frente a multitud de bacterias Gram positivas y Gram negativas, para los que apenas se han descrito fenómenos de resistencia gracias a la diversidad de mecanismos de acción que desarrollan sus múltiples principios activos. Dentro de la composición de los aceites esenciales se incluyen numerosos principios activos de naturaleza volátil con actividad antimicrobiana por contacto gaseoso (Inouye *et al.*, 2001). Esta característica ha sido referida por diversos autores como una ventaja para la utilización de los aceites esenciales en patologías respiratorias y desinfección de instalaciones, al prevenir la formación de biofilms (Laird y Phillips, 2012).

La mayoría de estudios *in vitro* sobre el potencial de los AEs y los extractos de plantas y especias frente a bacterias del género *Streptococcus* spp. se han centrado en especies implicadas en patologías orales, respiratorias y cutáneas del hombre (*S. pneumoniae*, *S. mutans*, *S. pyogenes*), con notables diferencias en los resultados dependiendo de la bacteria y el aceite estudiado (Fabio *et al.*, 2007; Galvão *et al.*, 2012; Sfeir *et al.*, 2013; Freires *et al.*, 2015). Todos estos trabajos coincidieron al destacar el potencial antimicrobiano de los AEs de orégano, canela, tomillo, menta y clavo.

Las primeras investigaciones con *S. suis*, realizadas por Nantitanon y cols. (2007) para el AE de Chan (*Hyptis suaveolens*) y por Rojas y cols. (2012) para el AE de albahaca (*Ocimum basilicum*) destacaron la capacidad inhibitoria de ambos productos, si bien se limitaron al estudio cualitativo de su potencial por contacto mediante los métodos de dilución en agar y difusión por disco. Esta última técnica fue también seguida por Sithisarn y cols. (2015) con extractos acuosos y etanólicos de la planta *Cladogynos orientalis* Zipp. Ex Span (nombre común Chettaphnagki), sin que observara actividad alguna frente a las cepas clínicas de *S. suis*. No se han encontrado estudios sobre la acción volátil de los AEs frente a *S. suis*.

En base a estos resultados y a nuestras investigaciones previas con otras bacterias Gram positivas (*S. xylosus*, *S. epidermidis*) se diseñó un estudio preliminar cualitativo para comparar la capacidad inhibitoria, por contacto directo y vapor, de ocho

aceites esenciales frente a *Streptococcus suis*, a fin de seleccionar los cuatro mejores aceites para el estudio cuantitativo de su actividad inhibitoria y bactericida, y la valoración de su efecto combinado con antimicrobianos tradicionales.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas y aceites esenciales

Para el estudio cualitativo de los ocho AEs se utilizaron un total de 20 cepas de *S. suis* seleccionadas al azar entre los principales serotipos, así como la cepa de referencia europea P1/7, cuyas características microbiológicas han sido descritas en el Capítulo 3 (Material y Métodos generales, Tabla 5).

Test de difusión por disco

El estudio de la actividad antimicrobiana de los AEs por contacto directo se realizó mediante el test de difusión por disco, siguiendo el protocolo descrito por el CLSI (2015) para los antibióticos e incluyendo las modificaciones propuestas por Huerta y cols. (2014) para aceites esenciales. A partir de un cultivo de 20-24 h sobre agar sangre, incubado a 35 °C en microaerofilia, se preparó un inóculo en solución salina estéril con $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Con una torunda estéril se inoculó la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton suplementado con sangre de oveja defibrinada estéril al 5% (MHS) y se colocó un disco blanco estéril de 6 mm de diámetro (Oxoid Ltd), previamente impregnado con 15 µl de AE puro. Cada aceite se ensayó de forma individual por triplicado. Las placas selladas con parafina se incubaron en microaerofilia a 35 °C durante 20-24 horas, al cabo de las cuales se determinó el diámetro de la zona de inhibición (incluidos los 6 mm del disco). El resultado final de la prueba para cada cepa se expresó como la media \pm desviación estándar de los 3 ensayos.

Todas las pruebas incluyeron controles de esterilidad (mediante incubación previa de las placas de agar a 35 °C durante 24 h), un control de crecimiento positivo de la cepa problema y controles de calidad (*S. pneumoniae* y disco de penicilina 10 UI, Oxoid, Ltd.). La concentración del inóculo se comprobó mediante recuento en placa.

Prueba de disco invertido

Para valorar la actividad antimicrobiana de los compuestos volátiles de los AEs se realizó la prueba de disco invertido (Ross *et al.*, 2001), simultáneamente al test de difusión para utilizar el mismo inóculo y controles de crecimiento y calidad. El disco impregnado con 15 μ l de aceite esencial puro se colocó en este caso en la tapa de la placa de agar MHS, previamente sembrada con el inóculo bacteriano ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml); de esta manera el aceite sólo actuó sobre la bacteria en su forma gaseosa. Las placas, selladas, se incubaron en microaerofilia a 35 °C durante 20-24 horas y se determinó el diámetro medio del halo de inhibición de los 3 ensayos.

Análisis estadístico

Los cálculos estadísticos se realizaron con el Software SPSS 15.0 (IBM Company, USA) y la hoja de cálculo Excel 2013 (Microsoft Corporation, USA). A partir de los resultados obtenidos en cada test se estimó el valor medio final de la zona de inhibición de cada AE frente a *S. suis*, con su correspondiente intervalo de confianza (NC95%), y la dispersión de los valores obtenidos para las 20 cepas mediante la desviación estándar y el rango [$V_{\text{mínimo}}-V_{\text{máximo}}$]. Posteriormente, se realizó la representación gráfica, mediante histograma, de las medias estimadas por AE y cepa, así como la clasificación de las cepas en base a la actividad inhibitoria de los AEs, siguiendo los criterios de Lv y cols. (2011) para las pruebas por contacto: sin halo de inhibición (diámetro de 6 mm = disco), diámetro > 6 y < 12 mm – actividad inhibitoria débil, ≥ 12 y < 20 mm – actividad inhibitoria moderada, y ≥ 20 mm – actividad inhibitoria fuerte. En el caso de la prueba por vapor, para la cual no se encontraron valores de referencia, se tomaron los mismos puntos de corte si bien sólo se consideró que no existía actividad inhibitoria ante la ausencia de halo (diámetro 0 mm): < 12 mm actividad inhibitoria débil, ≥ 12 y < 20 mm actividad inhibitoria moderada, y ≥ 20 mm actividad inhibitoria fuerte.

La comparación del potencial antimicrobiano de los ocho aceites se realizó a partir de los resultados del test de difusión por disco (acción por contacto). Tras comprobar la Normalidad de la distribución de las medias de cada aceite mediante el test de Shapiro-Wilk, se compararon con la prueba ANOVA de un factor para medidas repetidas utilizando el estadístico multivariado “Traza de Pillai” ($P < 0.05$), al no verse afectado

por la falta de esfericidad de la matriz de varianzas-covarianzas (prueba de Mauchly). Para la comparación *post hoc* de los efectos principales se ajustó el valor final de P (< 0.05) mediante la corrección de Bonferroni. Los resultados obtenidos permitieron establecer grupos de homogeneidad en base a la similar actividad de los aceites incluidos en un mismo grupo y a la diferencia significativa hallada con los miembros de los restantes grupos.

Resultados

Estudio cualitativo de la actividad antimicrobiana de los AEs por contacto directo

En base a los resultados de la prueba de difusión por disco se establecieron cinco grupos de homogeneidad (Tabla 6 y Anexo 2.1). Los aceites con una actividad inhibitoria significativamente mayor frente a *S. suis* fueron el tomillo rojo y el tomillo vulgar (Grupo I, \varnothing medio de la zona de inhibición 33,2 y 34,2 mm, respectivamente), seguidos del orégano (Grupo II) con un \varnothing medio 29,4 mm. La canela, menta y clavo (Grupo III) presentaron halos de inhibición notablemente inferiores a estos aceites (\varnothing medio 15,8-16,5 mm). La actividad antimicrobiana de la albahaca y el romero fue débil o nula.

Tabla 6. Zona media de inhibición (\pm desviación estándar mm), rango de valores e intervalo de confianza obtenidos para cada aceite en el test de difusión por disco.

	Aceite esencial	Media \pm SD	Rango	IC95%
Grupo I*	Tomillo rojo	34,2 \pm 8,2	24,3 – 49,3	32,1 - 36,3
	Tomillo vulgar	33,2 \pm 7,3	24,0 – 49,0	31,3 – 35,1
Grupo II	Orégano	29,4 \pm 5,8	22,0 – 40,3	27,9 – 30,9
Grupo III	Canela	16,5 \pm 5,2	6,0 – 27,0	15,1 – 17,8
	Menta	16,4 \pm 6,8	9,0 – 36,3	14,6 – 18,2
	Clavo	15,8 \pm 5,0	6,0 – 28,0	14,5 – 17,1
Grupo IV	Romero	10,3 \pm 2,4	6,3 – 15,7	9,64 – 10,86
Grupo V	Albahaca	7,1 \pm 1,0	6,0 – 9,0	6,81 – 7,32

* Grupos de homogeneidad ($P < 0.05$)

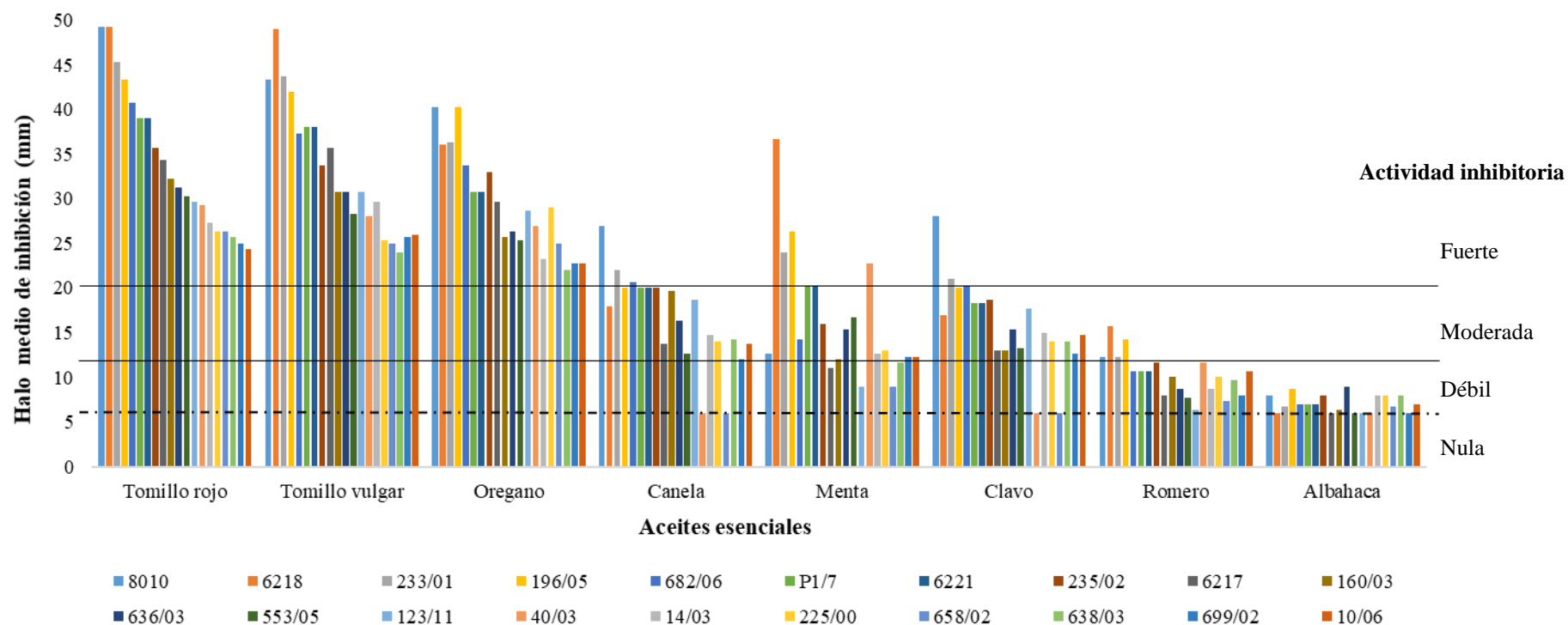


Figura 5. Halos medios de inhibición obtenidos por contacto para los ocho AEs y las veinte cepas de *S. suis*.

*Las líneas horizontales representan los valores establecidos por Lv *et al.* (2011) para la clasificación de la actividad inhibitoria de los AEs.

Como se aprecia en la tabla 6 y en la representación gráfica de los resultados obtenidos por AE y cepa (Gráfico 1), en general todos los productos mostraron una notable dispersión de los resultados en función de la cepa de ensayo, que fue máxima en el caso del tomillo rojo ($SD \pm 8,2$, rango 24,3-49,3 mm) y mínima para el romero y la albahaca. Los resultados detallados por cepa y aceite se describen en el Anexo 2.2.

Al clasificar las cepas en función de la actividad inhibitoria mostrada por los ocho AEs (Lv *et al.*, 2011) (Figura 6), observamos que para todas ellas los aceites de tomillo rojo, tomillo vulgar y orégano presentaron una actividad inhibitoria fuerte, mientras que la actividad de la albahaca fue en todos los casos nula o débil. Destacar, finalmente, la existencia de cepas con un perfil de inhibición para los ocho AEs similar.

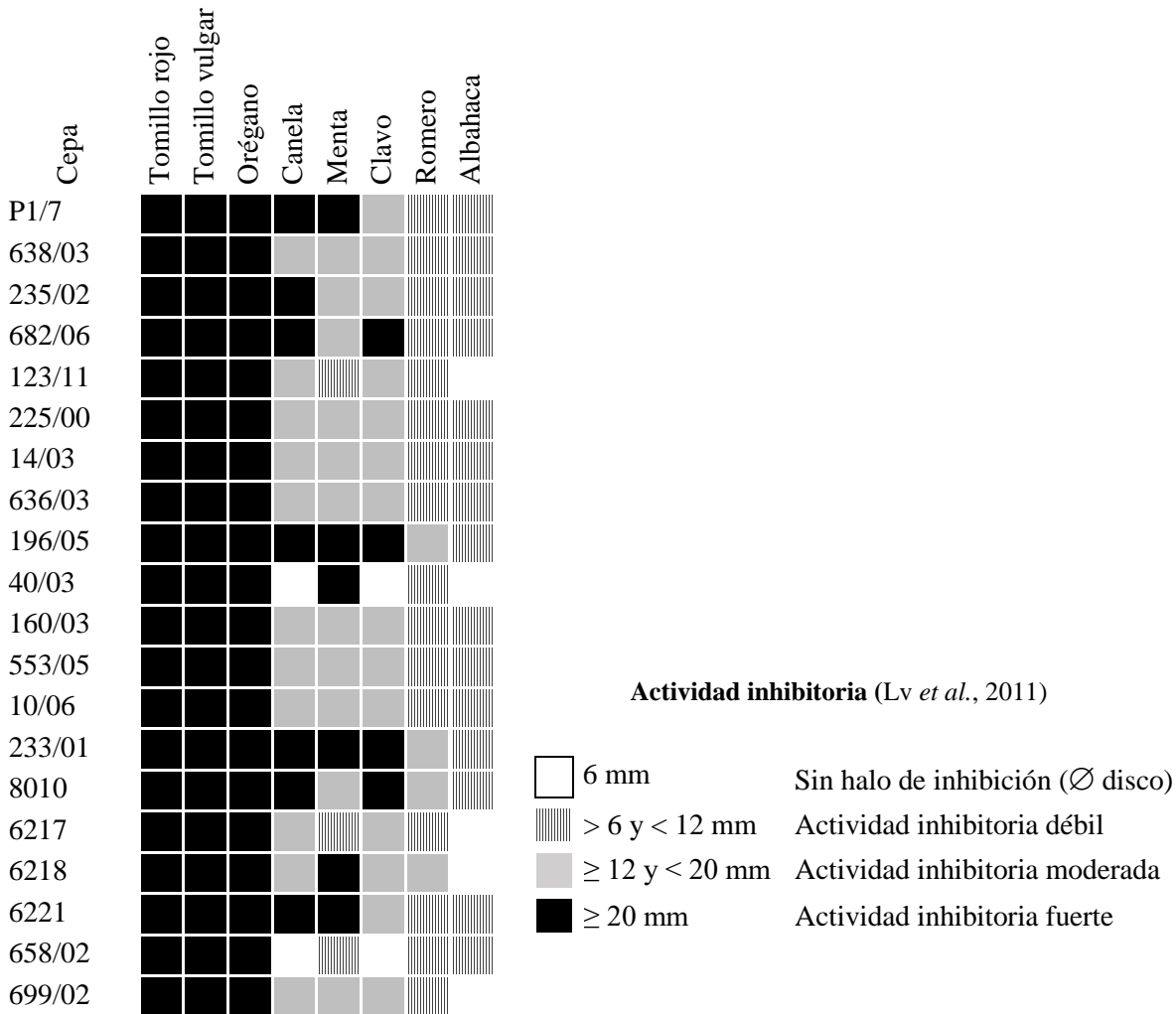


Figura 6. Clasificación de las cepas de *S. suis* en función de la actividad inhibitoria mostrada por los ocho AEs.

Estudio cualitativo de la actividad antimicrobiana de los AEs por acción del vapor

El efecto inhibidor de *S. suis* fue mayor por acción del vapor con el tomillo rojo, el tomillo vulgar y el orégano. Estos aceites mostraron un Ø medio de la zona de inhibición entre 23,3 y 25,7 mm (Tabla 7) y una fuerte actividad inhibitoria para el 90-100% de las cepas ensayadas (Figura 8). En el extremo opuesto, encontramos los AEs de albahaca, romero, canela y clavo, con una actividad inhibitoria por vapor débil o nulo para el 100% de los aislamientos (zona media de inhibición 0,0 y 0,8 mm).

Tabla 7. Zona media de inhibición (\pm desviación estándar mm), rango de valores e intervalo de confianza obtenidos para cada aceite en el test de acción por vapor.

Aceite esencial	Media \pm SD	Rango	IC95%
Tomillo rojo	25,7 \pm 5,1	20,0 – 42,5	23,3 – 28,1
Tomillo vulgar	25,6 \pm 4,4	19,5 – 37,5	23,5 – 27,7
Orégano	23,3 \pm 3,5	19,0 – 30,5	21,6 – 25,0
Canela	0,8 \pm 2,6	0,0 – 10,0	0,0 – 2,0
Menta	7,6 \pm 7,9	0,0 – 22,5	3,9 – 11,3
Clavo	0,8 \pm 2,6	0,0 – 10,0	0,0 – 2,0
Romero	0,4 \pm 1,8	0,0 – 8,0	0,0 – 1,2
Albahaca	0,0 \pm 0,0	0,0 – 0,0	0,0 – 0,0

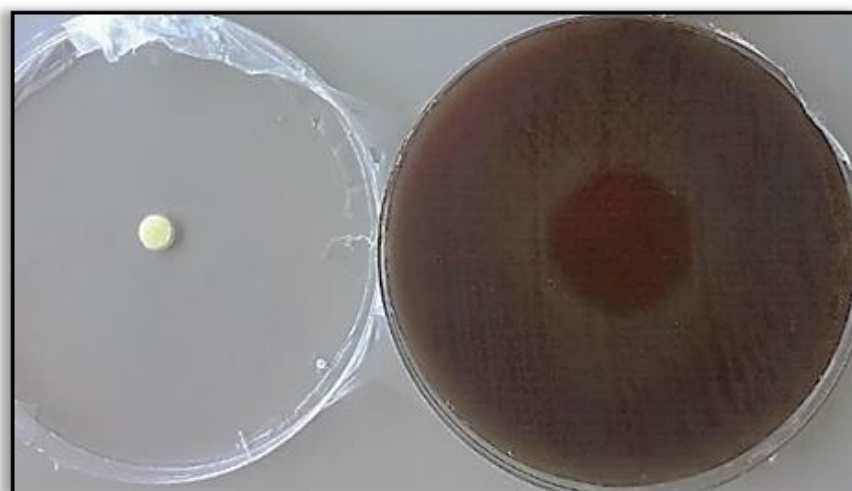


Figura 7. Zona inhibitoria producida por el efecto de la fracción volátil de aceite de orégano utilizando el método de placa de Petri invertida en MHA con 5% sangre desfibrinada de oveja.

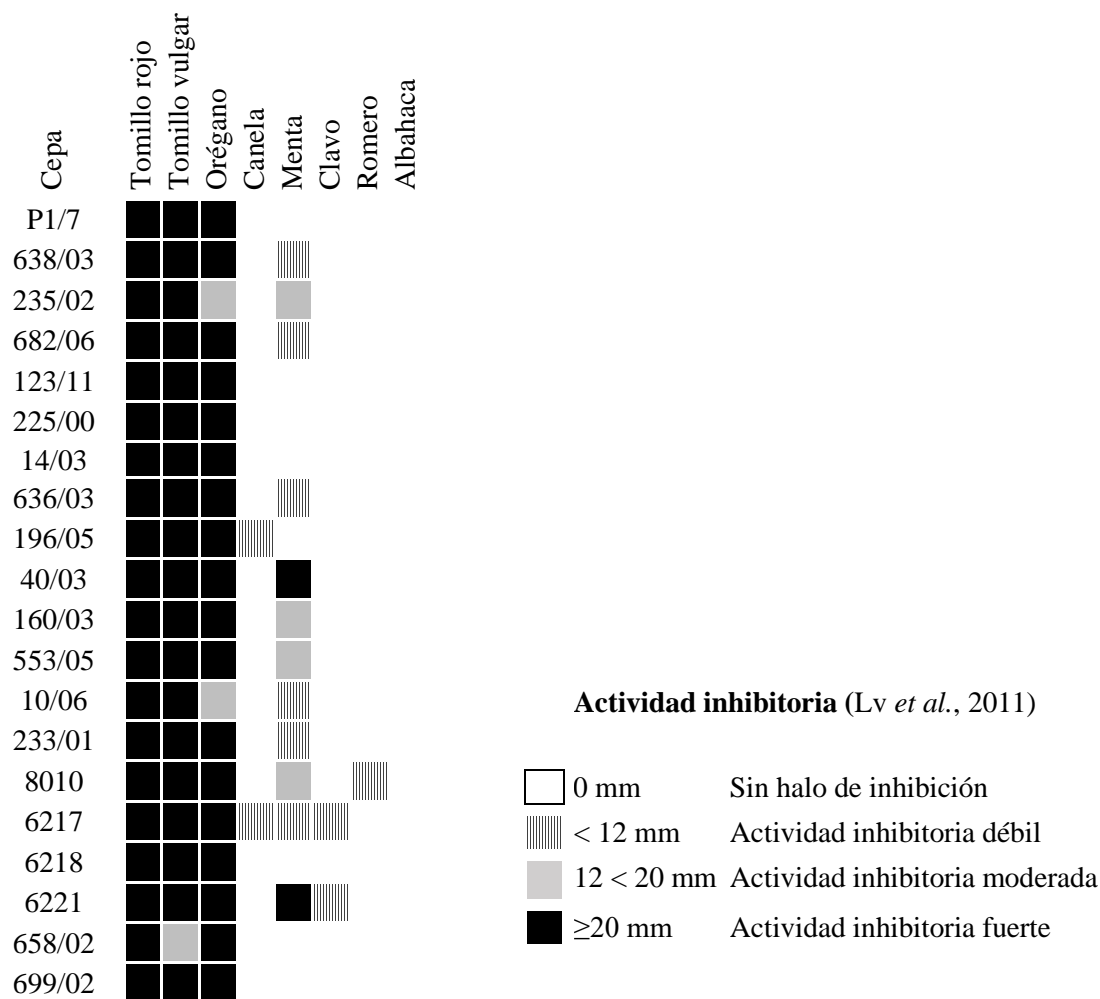


Figura 8. Clasificación de las cepas de *S. suis* en función de la actividad inhibitoria mostrada por los ocho AEs en la prueba con disco.

Al igual que en la prueba por contacto, las medidas de dispersión obtenidas (Tabla 7) y la representación gráfica de los halos medios de inhibición (Figura 8) mostraron una notable variación en la capacidad inhibitoria por vapor de los aceites en función del aislamiento bacteriano, destacando especialmente la menta con halos de 0,0 mm (sin actividad) a 22,5 mm (actividad fuerte).

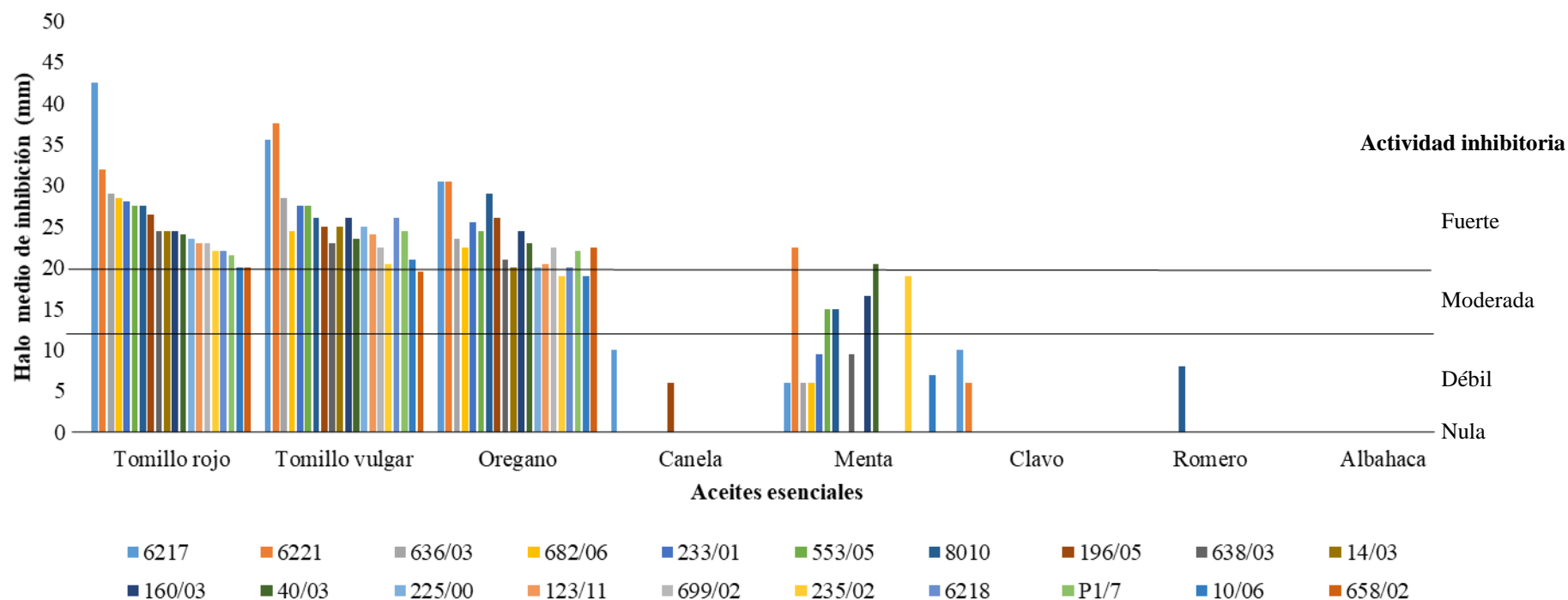


Figura 9. Halos medios de inhibición obtenidos por vapor para los ocho AEs y las veinte cepas de *S. suis*.

Discusión

Nuestro trabajo representa uno de los primeros estudios comparativo de la actividad inhibitoria de diversos aceites esenciales frente a *S. suis*. En la prueba de cribado por difusión en disco, el tomillo rojo, el tomillo vulgar y el orégano mostraron el mayor potencial frente a los aislados de campo de *S. suis*, y la cepa de referencia P1/7. De acuerdo con la clasificación propuesta por Lv y cols. (2011), estos aceites tendrían una actividad fuerte para todas las cepas ensayadas, coincidiendo con los resultados obtenidos por otros autores para estreptococos de origen humano (Fabio *et al.*, 2007; Galvão *et al.*, 2012; Sfeir *et al.*, 2013; Freires *et al.*, 2015). En el caso de canela, menta y clavo, destacados también en estos trabajos por su potencial inhibidor, la actividad desarrollada fue en general moderada si bien se observó una gran variabilidad en los resultados, encontrando desde una inhibición fuerte a la ausencia total de actividad según la cepa de ensayo. Sin embargo, la diferencia más significativa con la bibliografía previa se halló para la albahaca, cuya débil actividad frente a todas las cepas estudiadas (zona de inhibición 6.0-9.0 mm) contrastó notablemente con la fuerte inhibición descrita por Rojas *et al.* (2012) (zona de inhibición de 30 mm). La discrepancia entre ambos estudios probablemente se deba a diferencias en la composición de los aceites como consecuencia del método de extracción, el origen geográfico y la variedad botánica de la planta (Oladimeji *et al.*, 2001), si bien debemos considerar también el escaso número de cepas ensayadas por estos autores (1 cepa campo). Como reflejan los resultados obtenidos en esta tesis y nuestras investigaciones previas con otros microorganismos (Peñalver *et al.*, 2005; Huerta *et al.*, 2016; Solarte *et al.*, 2018), muchos AEs muestran una considerable variabilidad en su capacidad de inhibición en función de la cepa, por lo que los estudios limitados a cepas de referencia y/o un número reducido de cepas clínicas podrían carecer de precisión.

Los AEs son una mezcla compleja de sustancias químicas (hidrocarburos terpénicos y compuestos aromáticos), muchas de las cuales están presentes en trazas. Su efecto antimicrobiano se debe 1) a la acción directa sobre la bacteria de los compuestos no volátiles, dependiendo la magnitud de este efecto de su solubilidad en el agar, y 2) a la acción de los componentes volátiles como consecuencia de la absorción directa del vapor por el microorganismo, relacionada con la velocidad de evaporación y la concentración inicial de exposición, y al efecto indirecto a través del medio, como consecuencia de la absorción por éste del vapor. Esta absorción depende de la

hidrofobicidad, volatilidad y estabilidad del compuesto volátil (Moleyar y Narasimham, 1986; Inouye *et al.*, 2001). Para muchos aceites se ha demostrado que una parte importante de su actividad antimicrobiana es debida a los componentes principales, de tal forma que los AEs que contienen alcoholes, cetonas, ésteres, óxidos e hidrocarburos inhiben el crecimiento bacteriano fundamentalmente por acción de los vapores, mientras que los AE que contienen mayores volúmenes de aldehídos, la inhibición proviene de la difusión (Moleyar y Narasimham, 1986; Inouye *et al.*, 2006). De este modo, la concentración de los principales componentes activos influiría notablemente en las variaciones de la actividad de un mismo aceite, a lo que debemos unir las sinergias que pueden establecerse con los principios minoritarios. En base a ello, muchos autores consideran que el AE completo tendría más actividad que sus principios activos por separado (Gill *et al.*, 2002; Lahlou, 2004; Burt *et al.*, 2005; Jakhetia *et al.*, 2010;). Nuestro estudio cualitativo de la acción por vapor mostró una notable inhibición del crecimiento de *S. suis* por el tomillo (rojo y común) y el orégano, con zonas de inhibición similares o ligeramente inferiores a las observadas en la prueba por contacto, lo que podría explicarse por las características químicas del carvacrol y el timol, sustancias poco volátiles pero muy estables y moderadamente solubles en agua, capaces de alcanzar notables concentraciones en el agar bien de forma directa, por disolución, bien de forma indirecta, por absorción del vapor, desarrollando su acción principalmente por contacto (Inouye *et al.*, 2006). Para canela, clavo, romero y albahaca, la prueba gaseosa mostró una débil o nula actividad, resultados que contrastan con los hallados por Inouye y cols. (2001) para *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*, con una actividad notable para la canela y moderada para el romero. En base a lo expuesto anteriormente, el componente principal de la canela, el cinamaldehído, desarrollaría principalmente su acción por difusión en el agar, lo que explicaría nuestros resultados, pudiendo estar las diferencias observadas por Inouye y cols. (2001) asociadas a variaciones en la composición de los aceites, especialmente de los principios volátiles, y en menor medida a diferencias en la concentración inicial de exposición (Inouye *et al.*, 2001, 2006).

Los estudios comparativos de los métodos de ensayo con aceites esenciales destacan la utilidad de la prueba de difusión por disco como test de cribado (López *et al.*, 2005); sin embargo, la determinación del potencial antimicrobiano de estos productos precisa el estudio cuantitativo de su actividad inhibitoria y bactericida. En

base a ello y a los resultados de este objetivo, se seleccionaron los tres AEs con un potencial inhibidor fuerte (tomillo rojo, tomillo vulgar y orégano) y la canela, del grupo con una actividad inhibitoria moderada para el ensayo cuantitativo. Dado que no existía diferencia significativa entre los aceites de este último grupo, la decisión se basó en los resultados publicados por diversos autores para otras especies de estreptococos y el efecto sinérgico mostrado por la canela, muy superior al del tomillo vulgar, el orégano y el clavo, con los antimicrobianos tradicionales (Inouye *et al.*, 2006; Solarte *et al.*, 2017). No se optó por la menta, a pesar de presentar mayor acción por vapor que canela y clavo, por la elevada variabilidad en los resultados del test por contacto y la escasa correlación presentada con los ensayos de microdilución en estudios previos con estafilococos realizados por nuestro grupo de investigación (Huerta *et al.*, 2016). En este sentido, Hernández y cols. (2005) ya señalaron que, dependiendo de la heterogeneidad del aceite para difundir a través del agar o su volatilidad, en función de la composición, temperatura externa y método de ensayo, podía ser que la prueba de difusión por disco presentara una débil correlación con la técnica de microdilución.

Capítulo 6

Segundo objetivo

“Valorar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales seleccionados y sus principales componentes activos frente a cepas de *S. suis*, de origen humano y porcino, aisladas en animales portadores y casos clínicos”

El interés principal de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* es proporcionar información sobre la elección del antibiótico apropiado, ayudando en la formulación de la terapia antimicrobiana. Para tal fin, las cepas bacterianas son clasificadas en susceptibles, resistentes y susceptibles dosis-dependiente, en base a puntos de corte clínicos (MacGowan y Wise, 2001; CLSI, 2015; EUCAST, 2017). Además, estas pruebas tienen importancia en salud pública, ya que los datos generados pueden utilizarse para realizar estudios epidemiológicos sobre la aparición y difusión de resistencia a los antimicrobianos en una población bacteriana. Los puntos de corte epidemiológicos (*Epidemiologic cutoff values* ECV, CLSI; ECOFF, EUCAST) permitirían diferenciar la subpoblación salvaje (sin mecanismos de resistencia mutacionales o adquiridos) de aquellos aislamientos con mecanismos de resistencia (Dalhoff *et al.*, 2009; CLSI, 2017; EUCAST, 2017).

Tradicionalmente, los puntos de corte clínicos se establecen en base a la distribución de la susceptibilidad de la población bacteriana (CMI) y el cálculo de la CMI₅₀ y 90, las características farmacocinéticas y farmacodinámicas del antimicrobiano y los resultados clínicos (Dalhoff *et al.*, 2009; CLSI, 2017). Para ello, es preciso estudiar un número grande de aislados (> 100 cepas de al menos tres laboratorios diferentes) mediante técnicas de microdilución estándar (CLSI, 2017).

A diferencia de los antibióticos, la mayoría de estudios sobre la susceptibilidad bacteriana a los antimicrobianos naturales se limitaron a una cepa de referencia o un número reducido de aislamientos clínicos (MacGowan y Wise, 2001; Silveira *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2013). La CMI y CMB estimadas en estos trabajos, expresadas habitualmente como la media de los valores obtenidos para el total de cepas, podría diferir notablemente de la concentración efectiva a alcanzar en el lugar de la infección (Griffin *et al.*, 2000; Becerril *et al.*, 2012). Asimismo, son limitadas las investigaciones *in vivo* sobre la difusión, metabolismo y toxicidad de estos productos, especialmente en el caso de los aceites esenciales por su compleja composición química, lo que ha impedido la determinación de puntos de corte estándar.

Existe cierta controversia sobre el origen del potencial antimicrobiano de los AE. Mientras algunos estudios muestran mayor susceptibilidad de las bacterias a los principios activos (especialmente timol, carvacrol y eugenol) (Freires *et al.*, 2015; Magi *et al.*, 2015), otros autores destacan el sinergismo entre las moléculas del AE y el desarrollo de múltiples mecanismos de acción como una ventaja del aceite esencial sobre los antibióticos y sus principios químicos (Skandamis *et al.*, 2001; Carson *et al.*, 2002; Rota *et al.*, 2004; Said *et al.*, 2015).

En base a ello, los objetivos específicos planteados en este capítulo fueron:

- Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y mínima bactericida (CMB) y potencial microcida de los aceites esenciales de orégano, tomillo vulgar, tomillo rojo y canela y de sus principales componentes (cinamaldehído, carvacrol y timol).
- Estudio de la distribución de la sensibilidad bacteriana a los aceites esenciales y sus principales componentes: cálculo de la CMI_{50 y 90} y CMB_{50 y 90}.
- Determinación de la curva de letalidad de los distintos productos a fin de establecer la dinámica de su acción microcida y la relación concentración-tiempo-efecto.

Material y métodos

Cepas bacterianas, aceites esenciales y principios activos

En el capítulo 3 (Tabla 1) se detalló la composición química y características botánicas de los AEs seleccionados para este objetivo (orégano, tomillo vulgar, tomillo rojo y canela) y sus principales componentes activos (cinamaldehído, carvacrol y timol).

El estudio de la sensibilidad de *S. suis* frente a estos productos se realizó con 60 cepas (Capítulo 3, Tabla 5), incluida la cepa de referencia europea P1/7, que se utilizó asimismo para el ensayo de la curva de letalidad.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y mínima bactericida (CMB)

Se realizó siguiendo el método de microdilución en caldo descrito por el CLSI (2013) para las pruebas de susceptibilidad *in vitro* con patógenos de origen animal

(Capítulo 3), si bien para facilitar la dilución de los aceites y la lectura de los resultados, se utilizó caldo infusión cerebro-corazón (ICC) suplementado con agar al 0,15% en vez de Mueller Hinton sangre (Mann y Markham, 1998).

De cada producto se prepararon ocho diluciones dobles seriadas en un rango final de 39,0625 a 5000 µg/ml, y se enfrentaron en placas microtiter (fondo U) con un volumen igual del inóculo bacteriano 10^6 UFC/ml. Todos los ensayos incluyeron controles de crecimiento positivo, negativo y la penicilina G como control de calidad. Las placas se incubaron a 35 °C durante 20-24 h en condiciones aeróbicas, comprobándose la concentración final del inóculo mediante recuento en placa.

La CMI se estableció como la menor concentración de AMB capaz de inhibir el crecimiento visible del inóculo bacteriano. A partir de los ensayos de CMI se determinó posteriormente la CMB (menor concentración capaz de reducir en un 99.9% el inóculo inicial), mediante siembra de 10 µL de los tres últimos pocillos sin crecimiento visible en agar MHS e incubación a 35 °C durante 20-24 horas en microaerofilia.

Cada prueba se realizó por triplicado y en caso de obtener una diferencia de ± 2 diluciones en alguna de las réplicas se realizó un cuarto ensayo, tomando como valor final para la CMI y la CMB la concentración más alta obtenida en todos los ensayos. Diferencias de ± 1 dilución no se consideraron significativas (CLSI, 2013).

Determinación de la curva de letalidad

Siguiendo el protocolo usado para el estudio de la cinética de muerte bacteriana con antimicrobianos tradicionales (CLSI, 1999; Pfaller *et al.*, 2004; Mayaud *et al.*, 2008), se inoculó la cepa de referencia de *S. suis* P1/7, a una concentración final 5×10^5 UFC/mL, en botes de cristal con 20 mL de caldo ICC conteniendo concentraciones de 0,5x, 1x, 2x y 4x CMI del producto de ensayo, y se incubó durante 24 h en baño maría a 36 °C con agitación (80 elevaciones por minuto, movimiento horizontal de vaivén). La suspensión bacteriana y las diluciones de ensayo se prepararon de acuerdo al método previamente descrito. El ensayo se realizó paralelamente con penicilina G (0,5x, 1x, 2x y 4x CMI) y un control de crecimiento positivo (caldo con inóculo bacteriano y sin antimicrobiano).

Para la determinación de la concentración de bacterias viables, se realizaron diluciones seriadas del inóculo bacteriano (1:10; 1:100; 1:1000...) y se sembraron 250 µl de la muestra inicial y de cada una de las diluciones en placas de agar sangre (5% de sangre desfibrinada estéril) tras 0 min, 1 min, 5 min, 15 min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 8h y 24h de incubación (Mayaoud *et al.*, 2008; Hsouna *et al.*, 2013; Wijesundara *et al.*, 2018). Tras incubar en microaerofilia a 35 °C durante 24 horas, se contaron las colonias de las placas que presentaban entre 30-300 unidad formadora de colonia (UFC) y se determinó la concentración final en base a la fórmula: recuento final = n° colonias x 4 x factor de dilución. El límite de detección de la prueba era de 10 UFC/ml (Baroni *et al.*, 2014). El ensayo se realizó por duplicado, en diferentes días, tomando como valor final la media de los dos ensayos.

Análisis de los datos

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando la hoja de cálculo SPSS Software 18.8 (IBM Company, Nueva York, USA) y Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA). Las variables dependientes (CMI y CMB) se trataron como variables numéricas ordinales con 8 categorías, según el rango de diluciones dobles seriadas de los productos naturales.

A partir de los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad *in vitro* se determinó la distribución de frecuencias de la CMI y la CMB de *Streptococcus suis* frente a cada uno de los productos ensayados. Para comparar la actividad antimicrobiana de los productos testados, se contrastó la normalidad de las distribuciones obtenidas para la CMI y la CMB mediante el test de Kolmogorov-Smirnov ($P < 0.05$) y, tras descartarla, se compararon mediante las pruebas no paramétricas de Friedman y Wilcoxon, con las correcciones correspondientes para un nivel final de significación (P) de 0,05.

A partir de la distribución de frecuencias se determinó, posteriormente, la CMI₅₀ y 90 y la CMB₅₀ y 90, entendidas como la dilución de producto capaz de inhibir y eliminar el 50% y el 90% de las cepas ensayadas, respectivamente (Chueca *et al.*, 2016). Asimismo, se representaron gráficamente mediante el programa estadístico ECOFFinder (EUCAST) los porcentajes de las frecuencias obtenidas.

El carácter bactericida o bacteriostático de los productos estudiados se valoró inicialmente mediante el cálculo del índice microcida ($IM = CMB/CMI$), estimado

- por cepa (Valor max CMB/Valor max CMI).
- para *S. suis* (CMB_{90}/CMI_{90}), considerando bactericidas los AMBs con un $IM_{90} < 4$ y bacteriostáticos aquellos con un $IM_{90} \geq 4$ (Schwarz *et al.*, 2010; Radhakrishnan *et al.*, 2011).

Para comparar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y sus principios activos se calcularon las ratios $\frac{CMI_{aceite}}{CMI_{principio\ ac.}}$ y $\frac{CMB_{aceite}}{CMB_{principio\ ac.}}$ por cepa y se representó gráficamente su distribución de frecuencias.

Finalmente, se clasificó la actividad inhibitoria de cada producto en base a los criterios de Freires y cols. (2015) como: sin actividad inhibitoria $CMI > 2000 \mu g/ml$; actividad débil CMI de $1001-2000 \mu g/ml$; actividad moderada CMI $501-1000 \mu g/ml$; actividad fuerte CMI $101-500 \mu g/ml$; actividad muy fuerte $CMI \leq 100 \mu g/ml$.

El estudio del efecto bactericida se completó con las curvas de letalidad, mediante representación gráfica en escala semilogarítmica de la concentración media de bacterias viables (\log_{10} UFC/ml) por tiempo de exposición y concentración de producto (Microsoft Excel, USA).

A partir de los resultados obtenidos, se cuantificó la actividad antibacteriana (E) como la diferencia entre el recuento de bacterias viables (\log_{10} UFC/mL) al inicio ($nt-0$) y al final del ensayo ($nt-24$) según la siguiente ecuación: $E = nt-24 - nt-0$. En base a los criterios propuestos por Sidhu y cols. (2011) se establecieron tres puntos de corte teóricos:

- a) Efecto bacteriostático: $E=0$; no hay cambios de valor de $nt-0$;
- b) Efecto bactericida: $E=-3$; hay reducción de $\geq 3 \log_{10}$ (99,90%) respecto del \log_{10} de $nt-0$ y
- c) Efecto de erradicación virtual de bacterias: $E = -4$; hay reducción de $\geq 4 \log_{10}$ (99,99%) respecto del \log_{10} de $nt-0$.

Asimismo, se determinó la relación entre los valores de las concentraciones de cada producto ($\mu g/ml$) y los respectivos valores de E observados al final del ensayo

(24h) y se estimó la eficacia de cada concentración a las 8 h y 24 h (coincidiendo con el final de la fase de crecimiento logarítmico y el final del ensayo) como el porcentaje de reducción del número de bacterias viables respecto al inóculo inicial en un momento determinado (Baroni *et al.*, 2014).

Resultados

Pruebas in vitro de susceptibilidad bacteriana

El estudio cuantitativo de la actividad de los AEs seleccionados y sus componentes activos frente a *S. suis* mostró para la mayoría de cepas un comportamiento constante en los tres ensayos realizados por producto (2-3 réplicas con el mismo resultado y una variación máxima de 1 dilución). En el Anexo 3 se presentan todos los valores de CMI y CMB obtenidos por ensayo y cepa, y en el Anexo 4 las representaciones gráficas de los valores finales considerados para la CMI y CMB de cada producto y cepa.

Esta similitud en la susceptibilidad de las cepas a los AEs y CAs se apreció asimismo en la distribución de frecuencias. Como se aprecia en la tabla 8 y las gráficas del Anexo 5, todos los productos mostraron una distribución unimodal que, según las pruebas estadísticas realizadas, no cumplía con la Normalidad. En la misma tabla se describen las similitudes estadísticas halladas entre los siete productos de ensayo en base a la distribución de la CMI y la CMB.

En todos los casos se observó un rango de valores más probables, que fue especialmente estrecho para el orégano (CMI y CMB 156,25-312,5 µg/ml), mientras que en el caso de la canela los valores de CMI oscilaron de 312,5 a 1250 µg/ml y los de CMB de 312,5 a 2500 µg/ml. La distribución obtenida para los componentes activos mostró asimismo un desplazamiento a la izquierda, con respecto a su aceite esencial, que determinó una diferencia significativa entre ambos productos (Tabla 8).

En base a los valores 50 y 90 estimados para la CMI, carvacrol y timol mostraron la mayor actividad inhibitoria (156.25 µg/ml), seguidos del orégano, tomillo vulgar, tomillo rojo y cinamaldehído (312.5 µg/ml).

Tabla 8. Distribución de frecuencias de la CMI y la CMB en base al valor más alto obtenido para cada cepa por producto ensayado (n = 60).

		Distribución de frecuencias CMI								Parámetros estimados*	
		Diluciones ensayadas (µg/ml) & N° de cepas								CMI ₅₀	CMI ₉₀
Producto		39.062	78.125	156.25	312.5	625	1250	2500	5000	(µg/mL)	(µg/mL)
a**	Canela	0	0	0	13	29	18	0	0	625	1250
b	Orégano	0	0	20	40	0	0	0	0	312.5	312.5
b	Tomillo vulgar	0	0	16	42	2	0	0	0	312.5	312.5
b	Tomillo rojo	0	0	10	47	3	0	0	0	312.5	312.5
b	Cinamaldehído	0	0	15	41	4	0	0	0	312.5	312.5
c	Carvacrol	0	2	56	2	0	0	0	0	156.25	156.25
c	Timol	0	17	37	6	0	0	0	0	156.25	156.25

		Distribución de frecuencias CMB								CMB ₅₀	CMB ₉₀
Producto		39.062	78.125	156.25	312.5	625	1250	2500	5000	(µg/mL)	(µg/mL)
A	Canela	0	0	0	11	22	25	2	0	625	1250
B	Orégano	0	0	14	46	0	0	0	0	312.5	312.5
B C	Tomillo vulgar	0	0	14	41	5	0	0	0	312.5	312.5
C D	Tomillo rojo	0	0	9	40	11	0	0	0	312.5	625
D	Cinamaldehído	0	0	6	38	14	2	0	0	312.5	625
E	Carvacrol	0	0	53	6	1	0	0	0	156.25	312.5
F	Timol	0	14	40	6	0	0	0	0	156.25	156.25

*CMI₅₀ y CMB₅₀: concentración (µg/mL) obtenida para el 50% de las cepas (30/60). CMI₉₀ y CMB₉₀: concentración (µg/mL) obtenida para el 90% de las cepas (54/60).

**Las letras indican similitud estadística ($P > 0.05$, con las correcciones de Bonferroni).

Tanto el timol como el orégano y el tomillo vulgar presentaron CMBs 50 y 90 similares a las CMI, mientras que el tomillo rojo y el carvacrol vieron incrementada su CMB₉₀ en una dilución (625 y 312.5 µg/ml, respectivamente).

La estimación de estos parámetros y su comparación mediante el índice microcida demostró el carácter bactericida ($IM < 4$) de todos los productos ensayados, con una ratio CMB₉₀/CMI₉₀ igual a 1 en el caso de canela, orégano, tomillo vulgar y timol e igual a 2 para tomillo rojo, cinamaldehído y carvacrol. De los cuatro productos que mostraron el máximo potencial bactericida, el timol presentó la concentración efectiva más baja (156,25 µg/ml), seguido del orégano y el tomillo vulgar (312,5 µg/ml), así como el mayor porcentaje de cepas cuya inhibición y destrucción se logró a la misma concentración (CMB/CMI cepa = 1) (Figura 10). Destacar en el caso de la canela que, si bien su potencial microcida CMB₉₀/CMI₉₀ era igual a 1, casi un 22% de las cepas ensayadas tenían una CMB doble de la CMI.

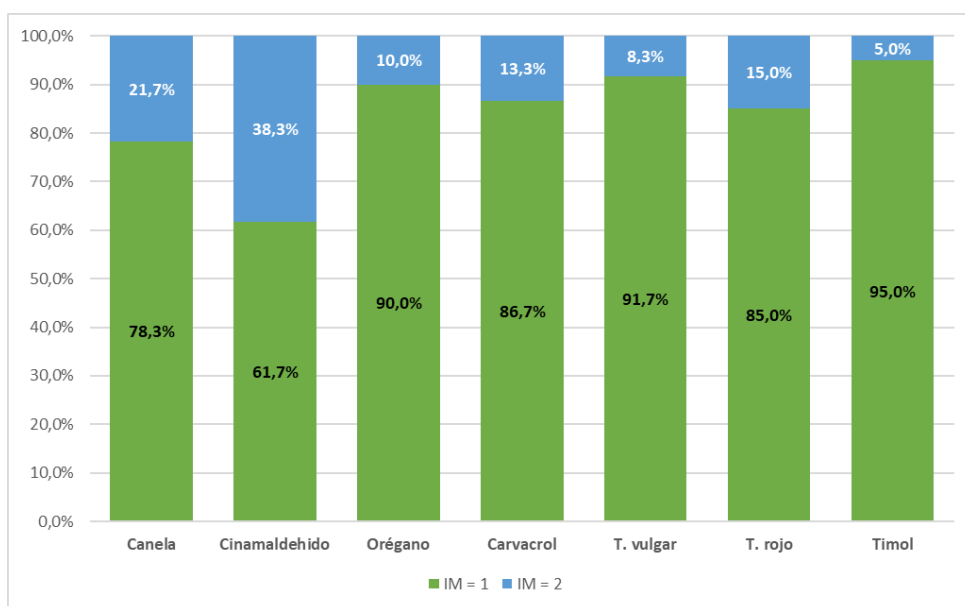


Figura 10. Frecuencia de los resultados obtenidos para el índice microcida por cepas y producto.

A fin de comparar la actividad antimicrobiana de cada AE y su principio activo, se estimaron las ratios $\frac{CMI_{aceite}}{CMI_{principio\ ac.}}$ y $\frac{CMB_{aceite}}{CMB_{principio\ ac.}}$ por cepa y se representó gráficamente su distribución de frecuencias (Figuras 11 y 12). Como se aprecia en las gráficas, en el caso del orégano la máxima diferencia que hubo entre el AE y el carvacrol fue de una dilución, tanto para la CMI como para la CMB (68,3% y 66,7% de

las cepas). Sin embargo, en el caso de los tomillos y la canela se precisó una concentración 4 u 8 veces mayor que la de su componente activo para lograr la inhibición o eliminación de un notable porcentaje de cepas (25%-41,7%).

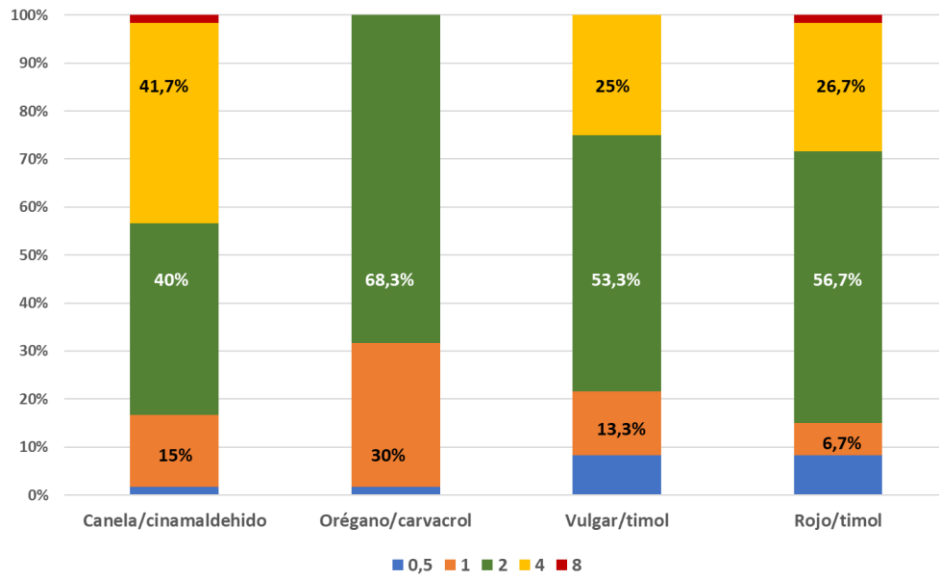


Figura 11. Porcentaje de cepas obtenido para cada una de las ratios $\frac{CMI_{AE}}{CMI_{CA}}$.

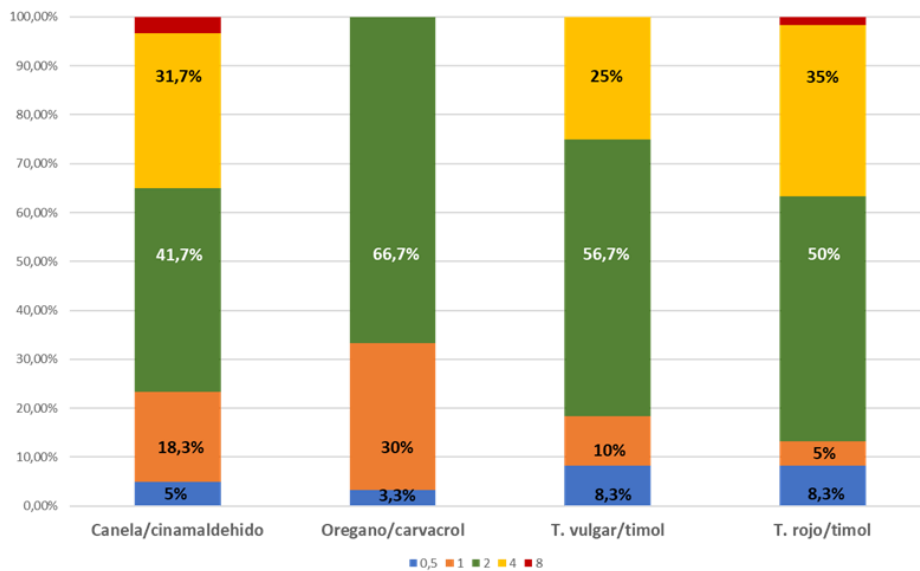


Figura 12. Porcentaje de cepas obtenido para cada una de las ratios $\frac{CMB_{AE}}{CMB_{CA}}$.

Siguiendo los criterios de clasificación establecidos por Freires y cols. (2015) para valorar la capacidad inhibitoria de los aceites esenciales, los mejores resultados se obtuvieron con timol, carvacrol y orégano, al mostrar actividad fuerte o muy fuerte con todas las cepas ensayadas (Figura 13). El porcentaje de aislamientos fuertemente

inhibidos fue del 28,3% en el caso del timol y del 3.4% con el carvacrol. Por su parte, cinamaldehído, tomillo vulgar y tomillo rojo presentaron una actividad principalmente fuerte (> 93% de las cepas), sin que en ningún caso se apreciara una inhibición débil.

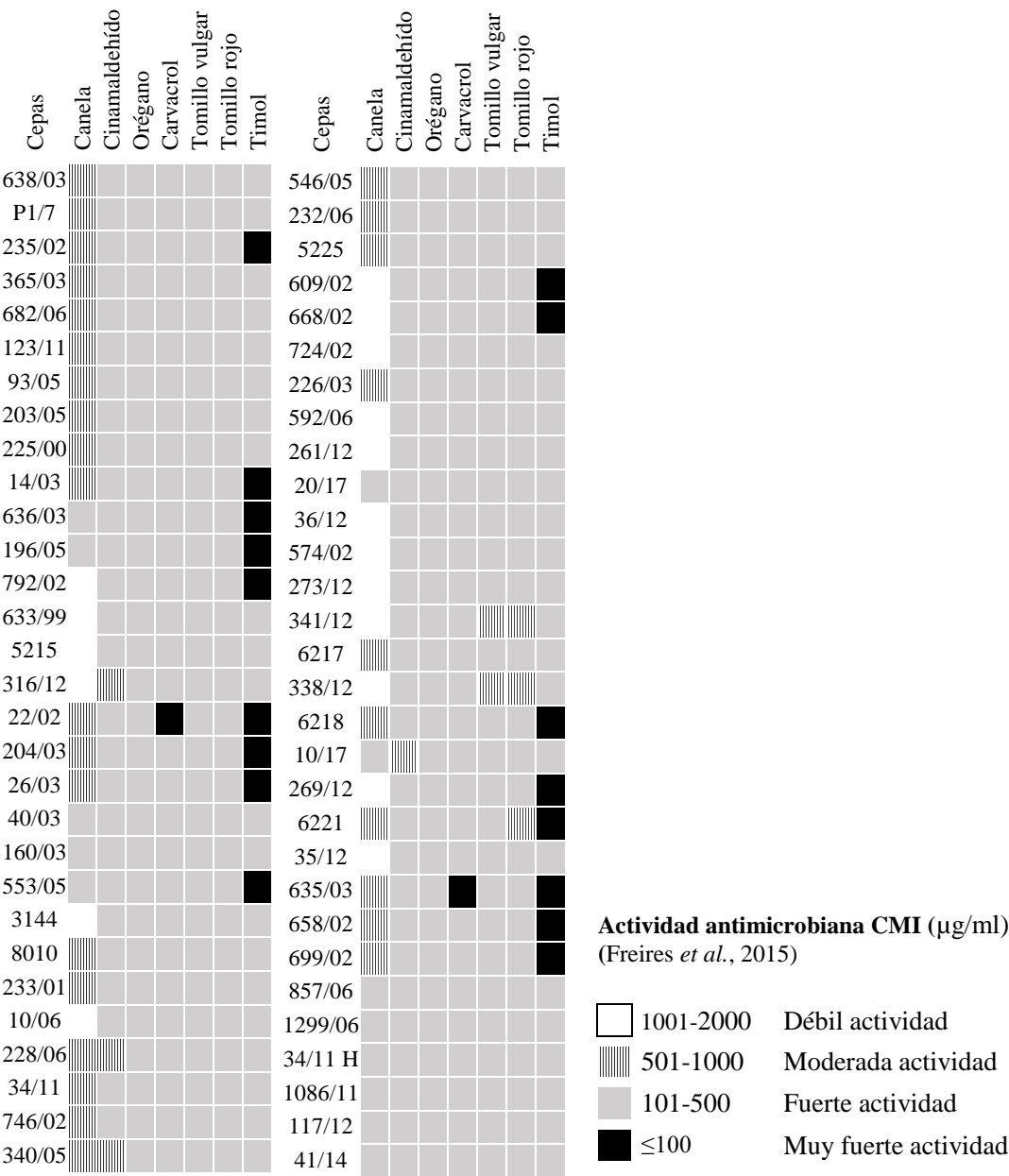


Figura 13. Clasificación de la actividad antimicrobiana de los productos naturales ensayados por cepa según los criterios de Freires y cols. (2015).

Destacar, finalmente, la notable variabilidad observada en la capacidad inhibitoria de la canela con un 28,3% de cepas inhibidas débilmente, un 50% con inhibición moderada y un 21,7% fuerte.

Curvas de letalidad

A fin de realizar una primera valoración de la eficacia, en función del tiempo, de distintas concentraciones de los aceites esenciales estudiados y sus principios activos se determinaron las curvas de letalidad para la cepa de referencia europea P1/7.

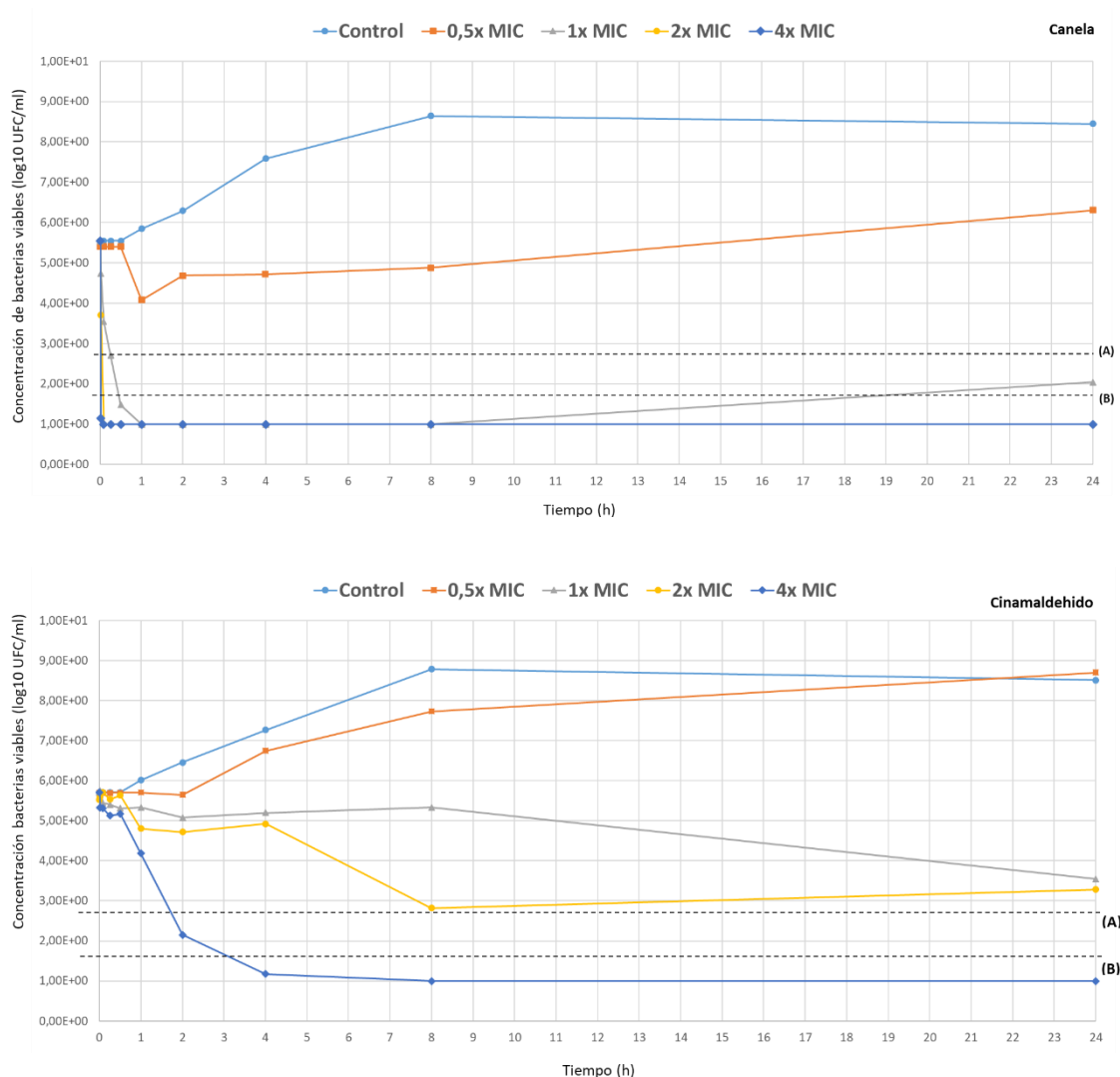


Figura 14. Curva de letalidad de *S. suis* P1/7 para la canela y el cinamaldehído. Las líneas de puntos horizontales marcan los puntos de corte teóricos y las áreas para evaluar la eficacia: (A) efecto bactericida (99.90%) y (B) erradicación virtual de las bacterias (99.99%).

Los resultados obtenidos para la *canela* (CMI cepa P1/7 de 625 µg/ml y CMB 625 µg/ml) y el *cinamaldehído* (CMI 312,5 µg/ml y CMB 312,5 µg/ml) mostraron notables diferencias en la actividad de ambos productos (Figura 14). Así, el cinamaldehído a dosis sub-inhedoras (0.5x) mostró una curva similar a la del control, con una fase de latencia de 2 h, y la canela produjo un efecto bacteriostático con una

eficacia máxima del 92,06% a la hora de exposición, si bien a partir de ese momento su actividad disminuyó observándose un recrecimiento de las bacterias por encima del inóculo inicial.

A concentraciones iguales a la CMI la canela mostró efecto bactericida a partir de los 15 minutos y erradicación virtual a la hora de exposición, aunque posteriormente volvió a apreciarse un suave crecimiento de la población bacteriana residual, por lo que a las 24 h su efecto era bactericida (Tabla 9 y Figura 14). Por el contrario, el cinamaldehído mostró durante todo el ensayo un efecto bacteriostático, con una eficacia máxima del 99,33% a las 24 h.

Tabla 9. Eficacia estimada para las distintas concentraciones de ensayo.

Canela				
Tiempo exposición	0.5x CMI (312.5 µg/ml)	1x CMI (625 µg/ml)	2x CMI (1250 µg/ml)	4x CMI (2500 µg/ml)
8 h	69,96% **	99,99%	99,99%	99,99%
24 h	-*	99,95%	99,99%	99,99%

Cinamaldehído				
	0.5x CMI (156,25 µg/ml)	1x CMI (312,5 µg/ml)	2x CMI (625 µg/ml)	4x CMI (1250 µg/ml)
8 h	-	58,14%	99,80%	99,99%
24 h	-	99,33%	99,42%	99,99%

*(-) Sin eficacia (la población bacteriana era superior al inóculo inicial).
**Efecto bacteriostático, Efecto bactericida y Erradicación bacteriana virtual.

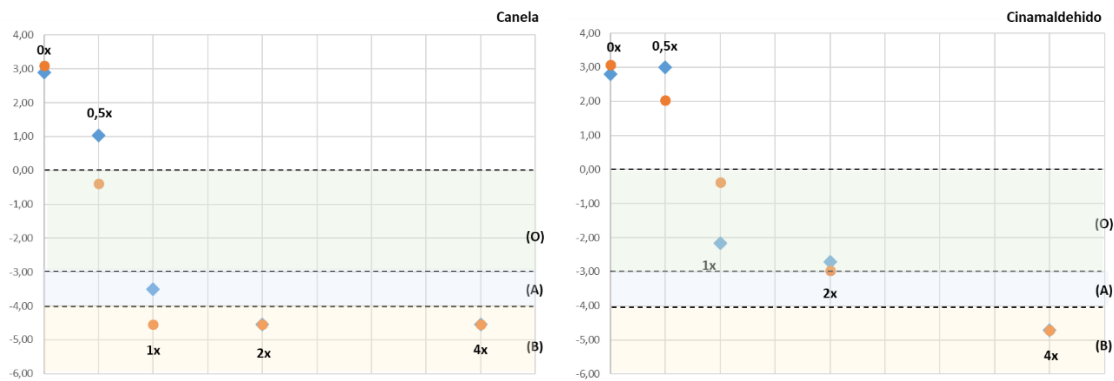


Figura 15. Relación entre las concentraciones de antimicrobiano (x CMI) y la diferencia entre los valores del log₁₀ del recuento de células viables (UFC/ml) a las 8 h (●) y las 24 h (◆) con respecto al inóculo inicial. Las líneas horizontales representan los puntos de corte teóricos y las áreas para evaluar la eficacia del antibiótico: (O) efecto bacteriostático, (A) efecto bactericida y (B) erradicación bacteriana virtual.

Finalmente, a concentraciones de 2x y 4x CMI la canela logró la erradicación a los 5 min y 1 min, respectivamente, manteniéndose este efecto hasta el final del ensayo (Figura 15). En el caso del cinamaldehído, sólo la concentración 4x alcanzó una eficacia del 99,99%, si bien se produjo entre las 2-4 h de exposición. A diferencia del aceite, el principio activo a dosis 2x CMI mostró actividad inhibitoria durante todo el ensayo, logrando su máximo efecto a las 8 h (eficacia 99,8%).

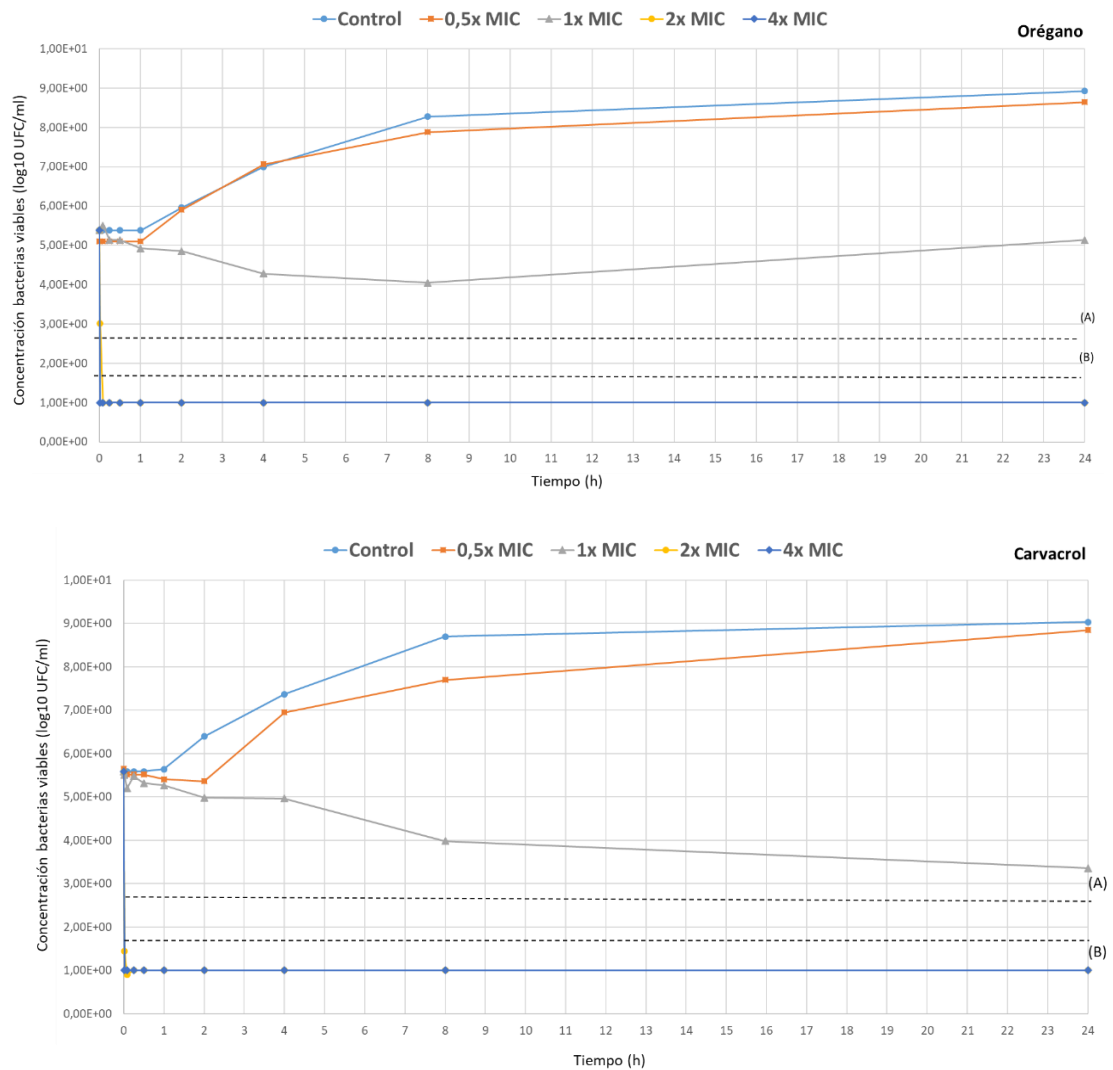


Figura 16. Curva de letalidad de *S. suis* P1/7 para el orégano y el carvacrol. Las líneas de puntos horizontales marcan los puntos de corte teóricos y las áreas para evaluar la eficacia: (A) efecto bactericida (99.90%) y (B) erradicación virtual de las bacterias (99.99%).

El *orégano* (CMI 156,25 µg/ml y CMB 312,5 µg/ml) y el *carvacrol* (CMI y CMB 156,25 µg/ml) mostraron una cinética bastante similar para todas las concentraciones ensayadas (Figura 16 y 17), no apreciándose actividad antimicrobiana a la dosis más baja (0,5x).

Por el contrario, a dosis iguales a la CMI tanto el aceite como el principio activo resultaron bacteriostáticos, si bien la eficacia del *orégano* disminuyó de forma significativa al final del ensayo (43,33%) mientras que el *carvacrol* alcanzó valores próximos al límite bactericida (Tabla 10). A concentraciones supra-inhibitorias, ambos productos lograron la erradicación virtual desde los cinco minutos de exposición.

Tabla 10. Eficacia estimada para las distintas concentraciones de ensayo.

Orégano				
Tiempo exposición	0.5x CMI (78,125 µg/ml)	1x CMI (156,25 µg/ml)	2x CMI (312,5 µg/ml)	4x CMI (625 µg/ml)
8 h	-*	95,33% **	99,99%	99,99%
24 h	-	43,33%	99,99%	99,99%

Carvacrol				
	0.5x CMI (78,125 µg/ml)	1x CMI (156,25 µg/ml)	2x CMI (312,5 µg/ml)	4x CMI (625 µg/ml)
8 h	-	97,53%	99,99%	99,99%
24 h	-	99,35%	99,99%	99,99%

*(-) Sin eficacia (la población bacteriana era superior al inóculo inicial).

**Efecto bacteriostático, Efecto bactericida y Erradicación bacteriana virtual.

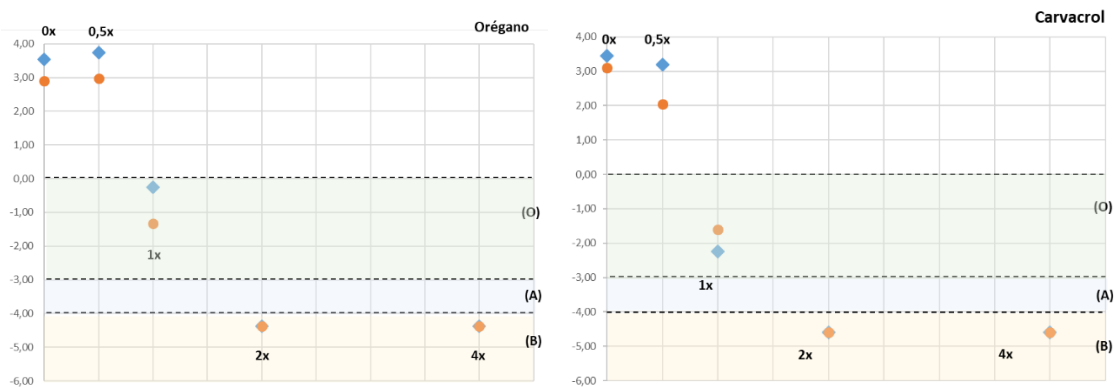


Figura 17. Relación entre las concentraciones de antimicrobiano (x CMI) y la diferencia entre los valores del log10 del recuento de células viables (UFC/ml) a las 8 h (●) y las 24 h (◆) con respecto al inóculo inicial. Las líneas horizontales representan los puntos de corte teóricos y las áreas para evaluar la eficacia del antibiótico: (O) efecto bacteriostático, (A) efecto bactericida y (B) erradicación bacteriana virtual.

Por su parte, las curvas de letalidad obtenidas del *tomillo vulgar* (CMI 156,25 µg/ml y CMB 156,25 µg/ml), *tomillo rojo* (CMI 312,5 µg/ml y CMB 312,5 µg/ml) y

timol (CMI 156,25 $\mu\text{g/ml}$ y CMB 156,25 $\mu\text{g/ml}$) mostraron efecto bacteriostático para el tomillo rojo y el timol a concentraciones sub-inhibitorias durante las primeras 8 h, mientras que el tomillo vulgar mostró una cinética similar a la del control.

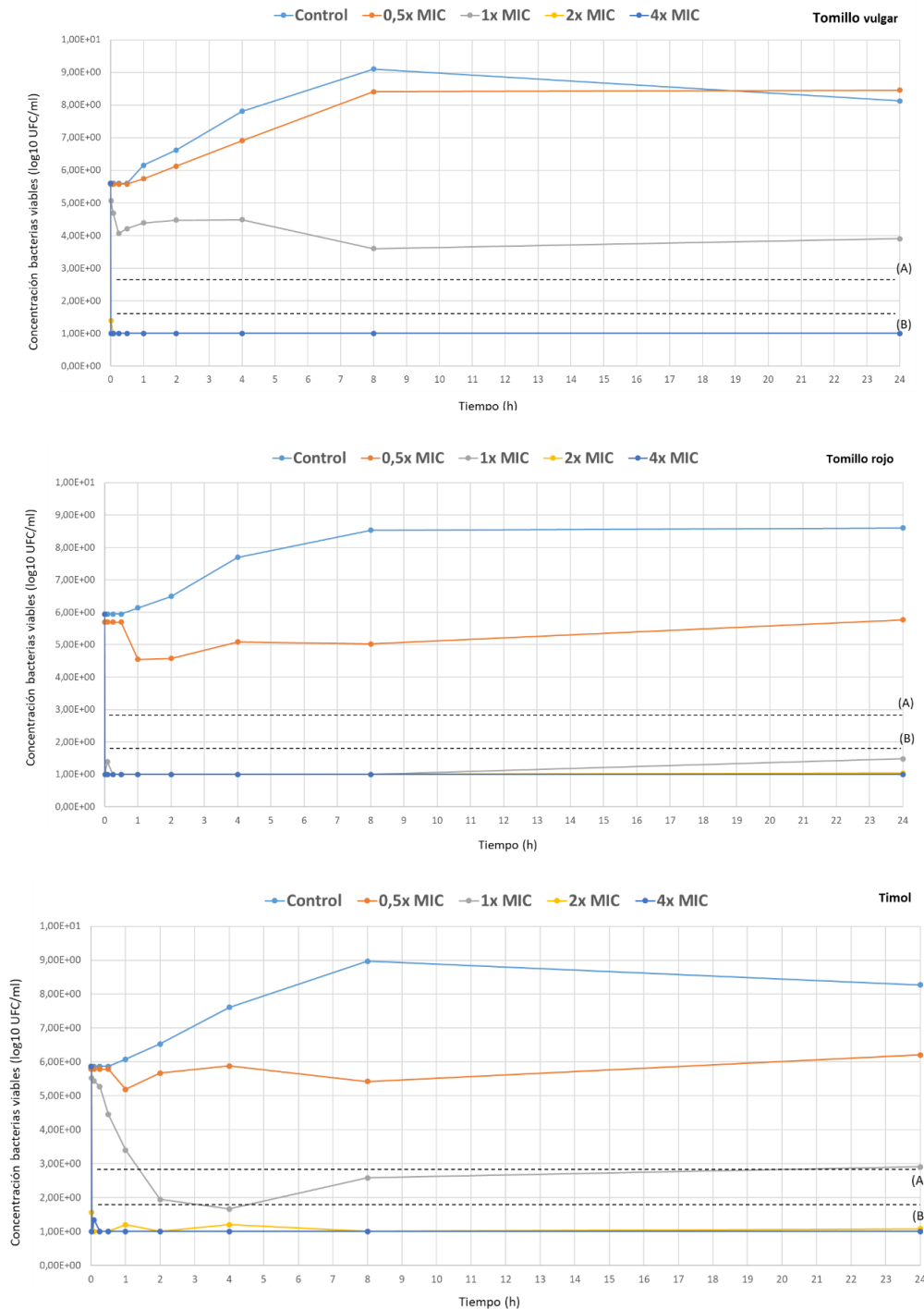


Figura 18. Curva de letalidad de *S. suis* P1/7 para tomillo vulgar, tomillo rojo y timol. Las líneas de puntos horizontales marcan los puntos de corte teóricos y las áreas para evaluar la eficacia: (A) efecto bactericida (99.90%) y (B) erradicación virtual de las bacterias (99.99%).

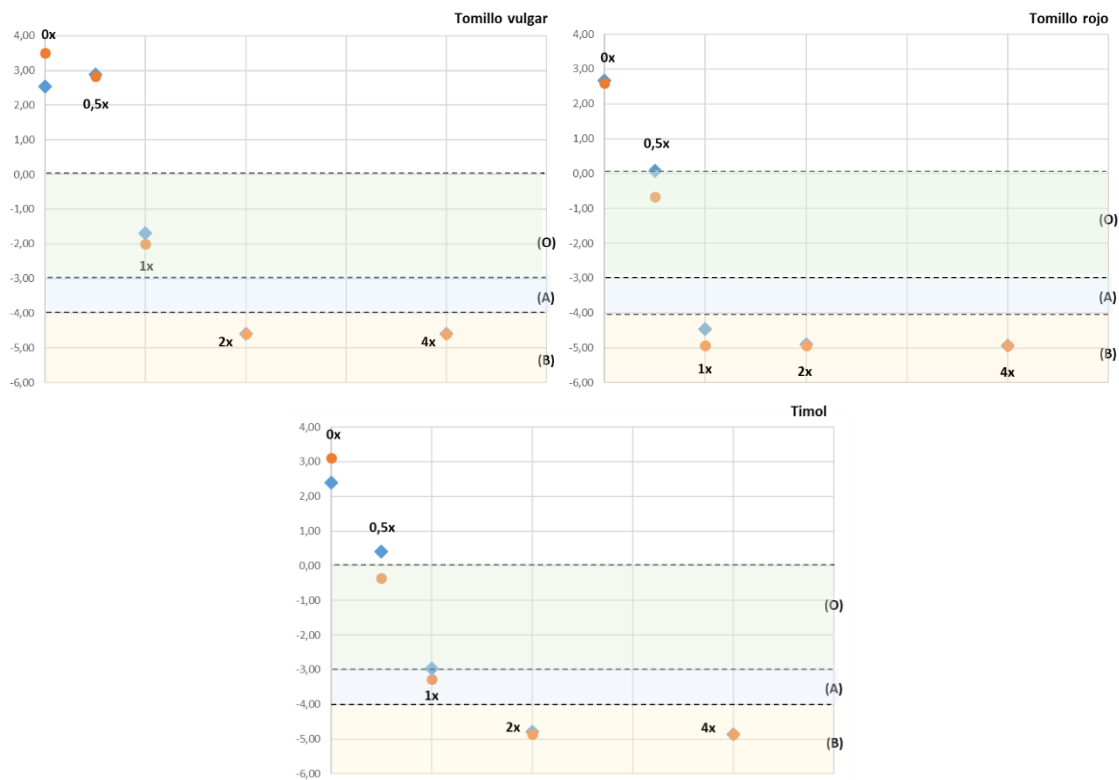
Tabla 11. Eficacia estimada para las distintas concentraciones de ensayo.

Tomillo vulgar				
Tiempo de exposición	0.5x CMI (78,125µg/ml)	1x CMI (156,25µg/ml)	2x CMI (312,5µg/ml)	4x CMI (625µg/ml)
8 h	-*	98,99%**	99,99%	99,99%
24 h	-	97,98%	99,99%	99,99%

Tomillo rojo				
	0.5x CMI (156,25µg/ml)	1x CMI (312,5µg/ml)	2x CMI (625µg/ml)	4x CMI (1250µg/ml)
8 h	78,63%	99,99%	99,99%	99,99%
24 h	-	99,99%	99,99%	99,99%

Timol				
	0.5x CMI (78,125µg/ml)	1x CMI (156,25µg/ml)	2x CMI (312,5µg/ml)	4x CMI (625µg/ml)
8 h	57,00%	99,95%	99,99%	99,99%
24 h	-	99,89%	99,99%	99,99%

*(-) Sin eficacia (la población bacteriana era superior al inóculo inicial).
**Efecto bacteriostático, Efecto bactericida y Erradicación bacteriana virtual.



Figuras 19. Relación entre las concentraciones de antimicrobiano (x CMI) y la diferencia entre los valores del log₁₀ del recuento de células viables (UFC/ml) a las 8 h (●) y las 24 h (◆) con respecto al inóculo inicial. Las líneas horizontales representan los puntos de corte teóricos y las áreas para evaluar la eficacia del antibiótico: (O) efecto bacteriostático, (A) efecto bactericida y (B) erradicación bacteriana virtual.

A dosis equivalentes a la CMI, el tomillo vulgar resultó bacteriostático, el timol bactericida y el tomillo rojo logró la erradicación virtual (Tabla 11), si bien en las tres curvas pudimos observar un recrecimiento suave de las bacterias residuales al final del ensayo. En los tres casos se logró la erradicación virtual al minuto de exposición a concentraciones de 2 y 4 veces la CMI (Figura 19).

Finalmente, se representa la cinética de muerte obtenida con la penicilina, usada en este objetivo como control de calidad (Figura 20).

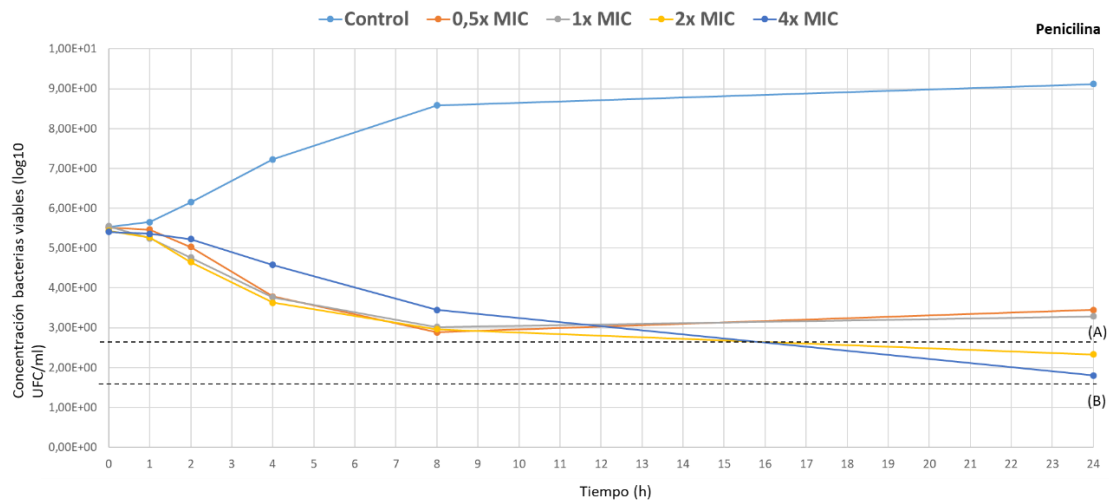


Figura 20. Curva de letalidad de *S. suis* P1/7 para la penicilina. Las líneas de puntos horizontales representan los puntos de corte teóricos para evaluar la eficacia: (A) efecto bactericida (99.90%) y (B) erradicación virtual de las bacterias (99.99%).

Discusión

El uso de productos de origen natural como promotores del crecimiento animal, por sus propiedades antimicrobianas, antioxidantes e inmunoestimulantes, es una práctica ampliamente extendida desde la prohibición de los antibióticos para este fin (EC, 2013; Peñalver *et al.*, 2005; Said *et al.*, 2015). Los procesos asociados a la infección por *Streptococcus suis* constituyen una de las principales causas de pérdidas económicas para el sector porcino y, sin embargo, apenas existen evidencias científicas sobre la susceptibilidad de este patógeno a los aceites esenciales y sus componentes activos (Nantitanon *et al.*, 2007; Rojas *et al.*, 2012).

En base a los datos obtenidos en el estudio cualitativo se seleccionaron los aceites de canela, orégano, tomillo vulgar y tomillo rojo, y sus principales componentes

activos (cinamaldehído, carvacrol y timol), para valorar su actividad frente a sesenta cepas de *S. suis* aisladas de cerdo y humana. Los resultados obtenidos demostraron el carácter bactericida de todos los productos ensayados (índice microcida = 1-2), confirmando el potencial antimicrobiano descrito con otras especies del género *Streptococcus* (Galvão *et al.*, 2012; Sfeir *et al.*, 2013; Freires *et al.*, 2015). Los valores estimados para la CMI₉₀ y la CMB₉₀ destacaron especialmente la actividad del timol, carvacrol, orégano y tomillos frente a la canela y el cinamaldehído, coincidiendo con nuestros resultados del ensayo cualitativo (prueba de difusión por disco) y los estudios bioquímicos que atribuyen mayor potencial antimicrobiano a los productos naturales con alto porcentaje de terpenoides (Nazzaro *et al.*, 2013). Otras bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus* spp., *Listeria* spp., *Clostridium* spp.), también han mostrado una notable susceptibilidad al orégano y el tomillo (Galvão *et al.*, 2012; Sfeir *et al.*, 2013). En el caso del carvacrol y el timol, esta actividad se basa en la disrupción de la membrana citoplasmática, con aumento de la permeabilidad, fuga de potasio y carboxifluoresceína al espacio extracelular y aumento del ATP extracelular, lo que altera su capacidad para mantener el gradiente de pH y llevar a cabo reacciones REDOX y procesos enzimáticos (Nazzaro *et al.*, 2013; O'Bryan *et al.*, 2015).

Estudios realizados con cepas de referencia de otras especies de estreptococos (*S. mutans*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae* y *S. pneumoniae*) han destacado también la actividad de los aceites de orégano y tomillo, si bien encontramos una considerable variabilidad en la CMI y la CMB según los autores (de 625 a 9700 µg/ml), con notables discrepancias con respecto a la CMI₉₀ y la CMB₉₀ estimadas en nuestro estudio (312.5 µg/ml) (Fabio *et al.*, 2007; Roldán *et al.*, 2010; Sfeir *et al.*, 2013). En dichos ensayos la canela mostró una actividad similar o mayor a la del tomillo y el orégano, con CMIs de 625 y 1900 µg/ml y CMBs de 625 y 2500 µg/ml (Fabio *et al.*, 2007; Sfeir *et al.*, 2013). Estos valores son superiores a los descritos por Galvão y cols. (2012) y Bardaji y cols. (2016) (CMI 200-500 µg/ml y CMB 400-1000 µg/ml), si bien todos ellos estarían de acuerdo con el rango de resultados obtenidos para nuestras cepas.

Las diferencias observadas entre los trabajos podrían deberse a variaciones en la composición de un mismo aceite (en función de la especie botánica, origen geográfico, parte de la planta y el método de extracción) y/o diferencias en la susceptibilidad de las especies y cepas bacterianas (Rota *et al.*, 2004; Peñalver *et al.*, 2005; Becerril *et al.*,

2012; Solarte *et al.*, 2018). Wijesundara y Rupasinghe (2018), en un ensayo reciente con *S. pyogenes*, atribuyeron la actividad del orégano ensayado (*Origanum vulgare*) (CMI y CMB 500 µg/ml) a su alta concentración de carvacrol (91.6%) y la presencia de otros componentes fenólicos, como p-cimeno, mirceno y γ -terpenos. De esta forma, la débil actividad descrita por Mayaud y cols. (2008) y Sfeir y cols. (2013) para el *Oreganum compactum*, frente a diversas especies de estreptococos -incluido *S. pyogenes*-, podría deberse a su inferior concentración de carvacrol (29.69% y 41.8%). El porcentaje de este principio activo en nuestro aceite de orégano (CMI₉₀ y CMB₉₀ 312,5 µg/ml) era del 63%, si bien contenía también un 10% de timol. Está aceptado que la presencia predominante de compuestos fenólicos determina una mayor actividad antibacteriana en el AE, si bien la acción sinérgica entre las diversas moléculas químicas es también extremadamente importante (Edwards-Jones *et al.*, 2004).

En el caso de timol, carvacrol y cinamaldehído, nuestros resultados (CMI₉₀ 156,25-3125,5 µg/ml) son, en general, similares a los descritos en trabajos previos con distintas especies de *Streptococcus* spp. (CMI 125-250 µg/ml), si bien el cinamaldehído mostró para algunas especies diferencias en la actividad inhibitoria (CMI 31,25-500 µg/ml) (Didry *et al.*, 1994; Mathela *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2017; Belato *et al.*, 2018; Firmino *et al.*, 2018).

Como ya indicamos anteriormente, la determinación de puntos de corte que guíen las pautas de administración y posibilidades de éxito de un tratamiento precisa el estudio de un número notable de aislamientos clínicos y cepas de campo (CLSI, 2017). De esta forma, los datos estimados en base a una o dos cepas tendrían una escasa precisión y validez interna. El estudio realizado en esta Tesis con sesenta cepas de *S. suis* aporta información novedosa y relevante sobre la susceptibilidad de esta población bacteriana a algunos de los aceites esenciales y principios activos con mayor potencial antimicrobiano. De acuerdo a la clasificación propuesta por Freires y cols. (2015), basada en una extensa revisión de la actividad inhibitoria de los AEs frente a patógenos orales -incluido el género *Streptococcus*-, los productos ensayados en esta tesis presentaron una actividad fuerte o muy fuerte frente a todas las cepas estudiadas, con excepción de la canela que presentó una actividad débil para el 28% de los aislamientos. Ensayos similares realizados por Magi y cols. (2015) sobre la susceptibilidad de 32 cepas de *S. pyogenes* frente al carvacrol y el tomillo (*Thymus capitatus*), hallaron rangos

de inhibición similares a los obtenidos en esta Tesis para *S. suis* (CMI carvacrol 64-256 µg/ml y CMI tomillo 256–512 µg/ml).

Los estudios comparativos sobre la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y sus componentes activos son bastantes limitados, y en el caso de *S. suis*, inexistentes. En general, obtuvimos mejores resultados con los principios activos, si bien en el caso de orégano y carvacrol la diferencia en su actividad para una misma cepa fue como máximo de una dilución, mostrando una actividad similar (fuerte) con el 96,6% (58/60) de las cepas (Freires *et al.*, 2015) y el mismo valor para la CMB₉₀. En el caso de los tomillos y la canela fue precisa una concentración hasta 4 u 8 veces mayor que de cinamaldehído y timol para inhibir y eliminar a más del 25% de las cepas.

Independientemente de los resultados obtenidos, la mayoría de trabajos coincidimos en el potencial bactericida de los aceites esenciales estudiados y sus principios activos (Sfeir *et al.* 2013; Freires *et al.*, 2015). El índice microcida determinado a partir de la CMB y la CMI aporta, sin embargo, un valor estático de este potencial. La curva de letalidad es un método cinético que permite valorar la eficacia, en función del tiempo, de distintas concentraciones de antimicrobiano y permite determinar si la actividad bactericida de un producto se potencia al aumentar las concentraciones o el tiempo de exposición (EUCAST, 2000; Vinks *et al.*, 2014)

En base a los resultados obtenidos, los productos ensayados en esta tesis tendrían carácter bactericida concentración-dependiente, con un perfil similar al que producen las curvas de aminoglucósidos y quinolonas. Como muestra la cinética, la tasa de muerte bacteriana se incrementó en todos los casos conforme aumentaba la concentración de producto por encima de la CMI; si fuesen tiempo dependientes las curvas 1x, 2x y 4x MIC serían muy similares, las pendientes no serían tan acusadas y sería más importante el tiempo de exposición que la concentración. Todos los productos, excepto el cinamaldehído, mostraron una fuerte y rápida actividad, logrando la erradicación virtual (eficacia 99,99%) a dosis de 2 y 4 veces la CMI en sólo 1-5 minutos de exposición. En el caso del cinamaldehído, la eliminación bacteriana se produjo de forma más lenta (2-6 h). Estudios previos realizados con *S. pyogenes* ATCC 19615 y *S. aureus* ATCC 25923 han destacado también el fuerte e inmediato efecto bactericida del aceite esencial de orégano (5-10 min.) a dosis iguales o superiores a la CMI (Mayaud *et al.*, 2008; Wijesundara y Rupasinghe, 2018). En estos trabajos, el

tomillo marroquí (*Thymus satureioides*: 13,54% timol) y la canela (*Cinnamomum verum*: cinamaldehído 68,79%) mostraron una actividad bactericida más lenta (30 min para *S. aureus* y 24 h para *S. pyogenes*), coincidiendo con los resultados descritos por Fadhlina y cols. (2016) para el cinamaldehído y otra variedad de canela (*C. burmannii*'s). En el caso del carvacrol y el timol, los datos publicados para *E. coli* por Xu y cols. (2008) muestran igualmente un aumento de la actividad bactericida dependiente fundamentalmente de la concentración, si bien la eliminación bacteriana precisó más tiempo de exposición (4-6 h), como consecuencia, probablemente, de la menor susceptibilidad descrita para las bacterias Gram-negativas (Mayaud *et al.*, 2008; Padalia *et al.*, 2015; Chouhan *et al.*, 2017).

Destacar finalmente, la observación para algunos de los productos ensayados (canela, orégano, tomillo rojo y timol) de un suave recrecimiento de la población bacteriana entre las 8 y las 24 h de exposición a concentraciones iguales a la CMI. Muchos autores finalizan los ensayos de letalidad a las 6 h de exposición, tras asumir una tasa de eliminación constante y logarítmica, para evitar el recrecimiento de las bacterias residuales que pudieron no entrar en contacto con el producto como consecuencia de los múltiples factores que afectan a la reproducibilidad de este método (adhesión de las bacterias a la pared del bote, falta de solubilidad de los antimicrobianos, etc.) (EUCAST, 2000; CLSI, 1999). Sin embargo, con este criterio no es posible poner de manifiesto la presencia de bacterias persistentes que podría afectar negativamente el éxito del tratamiento al contribuir a la aparición de cuadros clínicos crónicos y/o recurrentes (Cohen *et al.*, 2013). El fenómeno de persistencia ha sido descrito para otros bactericidas concentración-dependientes como las fluoroquinolonas a concentraciones iguales o superiores a la CMI (Patricelli *et al.*, 2017).

Aunque la CMI₉₀ y la CMB₉₀ halladas en nuestro trabajo están próximas o por encima de las dosis citotóxicas descritas por diversos autores (34,55-500 µg/ml) a partir de ensayos en líneas celulares, debemos considerar estos datos únicamente como una referencia ya que la diferente composición de nuestros aceites, con respecto a los testados, podría variar la toxicidad (Dušan *et al.*, 2006; Fabio *et al.*, 2007; Llana-Ruiz-Cabello *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2017; Belato *et al.*, 2018). Además, estos trabajos *in vitro* refieren que, en caso de administración oral, la regeneración natural del epitelio intestinal podría reparar el aumento de la necrosis y apoptosis celular inducida por los aceites y sus principios activos. Para minimizar estos efectos, una de las alternativas

sería el uso combinado de los productos naturales entre sí y/o con los antimicrobianos tradicionales para lograr su potenciación y una reducción de las dosis de administración.

Capítulo 7

Tercer objetivo

“Estudiar el efecto de la combinación de los aceites esenciales seleccionados y sus principales componentes con los antimicrobianos frecuentemente utilizados en el control de infecciones en el cerdo.”.

El control de la infección por *Streptococcus suis* se basa en el tratamiento con antimicrobianos convencionales y la implementación de medidas sanitarias a nivel de granja (Varela *et al.*, 2013). Sin embargo, desde hace una década existe una importante presión para reducir el uso de AMBs en la cría de cerdos debido al incremento de la resistencia bacteriana, el papel de los animales como reservorio de bacterias multirresistentes y la difusión de estos genes de resistencia entre patógenos animales (como *S. suis*) y patógenos de relevancia en medicina humana (*S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, etc.) (Palmieri *et al.*, 2011; Varela *et al.*, 2013).

Entre las estrategias propuestas para evitar el desarrollo de resistencia se encuentra la combinación de los AMBs con aceites esenciales, debido al efecto sinérgico que puede desarrollarse entre ellos (Magi *et al.*, 2015). Las primeras investigaciones desarrolladas con estreptococos han demostrado una interacción positiva (sinergismo y aditividad) entre antimicrobianos naturales, como el aceite de anís y el carvacrol, y antibióticos B-lactámicos, fluoroquinolonas y macrólidos (Gradinaru *et al.*, 2014; Magi *et al.*, 2015).

Este objetivo tiene como finalidad evaluar el potencial antimicrobiano de la combinación de diversos aceites esenciales y sus principales compuestos con antibióticos convencionales contra cepas resistentes de *S. suis* a estos AMBs.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas y antimicrobianos convencionales

En base a los resultados obtenidos en la caracterización previa del perfil de resistencia antimicrobiana de las 60 cepas (Capítulo 3), se seleccionaron para el ensayo de sinergia los 4 antimicrobianos con mayor porcentaje de resistencia (penicilina G, trimetoprim-sulfametoxazol, gentamicina y oxitetraciclina) (Sigma-Aldrich, Inc., Madrid, España) (Tabla 5) y 5 cepas resistentes a cada producto, coincidiendo en varios casos las cepas de ensayo como consecuencia de su carácter multirresistente. De este modo, se estudiaron un total de 9 cepas clínicas y la cepa de referencia europea P1/7.

Todas las cepas se mantuvieron -80°C en criobolas Microbank® (Pro-Lab Diagnostics Inc.).

Determinación de la CMI individual (CMI_I) en caldo infusión cerebro corazón

El diseño del ensayo de sinergia se basó en los valores de CMI obtenidos individualmente para cada uno de los productos incluidos en la combinación (AMB, AE y componente activo natural). Como indicamos anteriormente, para facilitar la lectura de los resultados en las pruebas de dilución con AEs se substituyó el caldo Mueller-Hinton sangre por Infusión Cerebro Corazón (ICC) (Mann y Markham, 1998; Sfeir et al., 2013), por lo que antes de iniciar la prueba de interacción fue preciso determinar la CMI de los AMBs en este nuevo medio para las diez cepas de ensayo.

Para ello, siguiendo el método convencional se enfrentaron diluciones dobles seriadas de AMB (penicilina G 0,016-32,0 $\mu\text{g/ml}$, trimetoprim-sulfametoxazol 0,25/4,7-512/9,728 $\mu\text{g/ml}$, gentamicina y oxitetraciclina 0,25-512 $\mu\text{g/ml}$) con un volumen igual del inóculo bacteriano preparado en caldo ICC (5×10^5 UFC/ml) y se incubaron las placas microtiter a 35°C , en atmósfera aeróbica, durante 20-24 h. Todos los ensayos se realizaron por triplicado e incluyeron controles de crecimiento positivo (caldo libre de antimicrobianos con inóculo bacteriano) y negativo (caldo libre de antimicrobianos sin inóculo). Como control de calidad, se realizó paralelamente el ensayo con MHS y la cepa de referencia *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

Prueba de interacción antimicrobiana

Mediante la técnica de checkerboard descrita por Si y cols. (2008) se valoró el efecto combinado de los AMB seleccionados con cada AE y su principal componente (PC). En una placa microtiter de 96 pocillos se enfrentaron once diluciones dobles seriadas de cada AMB (50 μl) y siete diluciones dobles seriadas de cada producto natural (50 μl), comenzando siempre en una dilución 4x CMI individual obtenida para cada cepa en caldo ICC. Posteriormente, se adicionó a cada pocillo 100 μl de inóculo bacteriano (10^6 ufc/ml).

La primera fila y la primera columna de cada placa se utilizaron como control de calidad y para determinar la CMI individual (CMI_A y CMI_B) de cada producto frente al inóculo de ensayo, conteniendo sólo 100 μL de la dilución del producto correspondiente

(AMB, AE o CA) y 100 µL de inóculo bacteriano. Todos los ensayos se realizaron por duplicado e incluyeron controles de crecimiento positivo y negativo. Las placas se incubaron a 35 °C durante 20-24 horas en atmósfera aeróbica.

		Dilución de antimicrobiano con respecto a la CMI _I (µg/mL)										
		4x	2x	1x	0,5x	0,25x	0,125x	0,0625x	0,03125x	0,015625x	0,0078125x	0,0039x
Dilución de producto natural con respecto a la CMI _I (µg/mL)	C+		CMI _A									
	4x											
	2x											
	1x											
	0,5x											
	0,25x											
	0,125x											
	0,0625x											

Figura 21. Método del Checkerboard.

Interpretación de los resultados

Mediante el programa Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA), se determinó la Fracción de la Concentración Inhibitoria (FCI_A y FCI_B) y el Índice de la Fracción de la Concentración Inhibitoria (FCI_{índice}) para cada una de las combinaciones ensayadas por fila y columna (Hemaiswarya *et al.*, 2008).

$$FCI \text{ índice } x.y = FCI_A x.y + FCI_B x.y = \frac{[A] \text{ pocillo } x.y}{CMI_A} + \frac{[B] \text{ pocillo } x.y}{CMI_B}$$

Siendo [A] y [B] la concentración de compuesto necesaria para inhibir el crecimiento de la cepa en esa fila o columna, y CMI_A y CMI_B el valor de CMI obtenido individualmente para cada producto en el ensayo de sinergia.

La interpretación final del FCI_{índice} se realizó en base a los criterios definidos por la European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2000) (tabla 12).

Tabla 12. Interpretación de los valores de FCI_{índice}

FCI _{índice}	Interpretación	
≤ 0,5	Sinergia	La actividad de la combinación es significativamente mayor que la suma de su actividad por separado.
> 0,5 ≤ 1	Aditividad	La actividad de la combinación es igual a la suma del efecto de ambos por separado.
> 1 < 2	Indiferencia	La actividad en combinación no es mayor que la actividad del producto más efectivo en solitario.
≥ 2	Antagonismo	El efecto de la combinación es menor que la suma de su actividad por separado.

De esta forma por cada placa se obtuvo normalmente más de un $FCI_{\text{índice}}$, tomando como resultado final el valor más bajo, y en caso de obtener el mismo valor varias veces la combinación con mayor reducción en la concentración eficaz de antimicrobiano.

Finalmente, mediante el software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc. California, CA, USA) se representaron gráficamente en isobologramas los índices FIC obtenidos para cada combinación con las cinco cepas ensayadas (Ahmad *et al.*, 2014).

Resultados

En la tabla 13 se detallan los valores de CMI obtenidos en caldo ICC para los AMBs, los AEs y los PCs estudiados en el ensayo de sinergia, así como la concentración de cada uno de estos productos en las combinaciones que resultaron más eficaces y los índices $FCI_{\text{índice}}$ estimados a partir de las mismas.

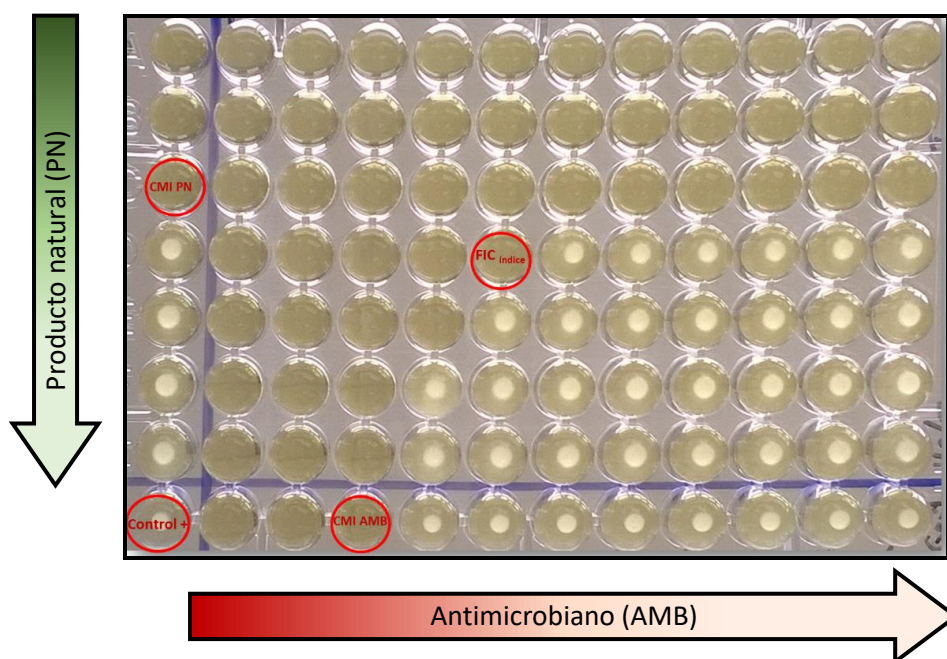


Figura 22. Método de *Checkerboard*. En la vertical y horizontal diluciones doble seriada del producto natural (PN) y del antibiótico (AMB), respectivamente. Flechas con gradiente de concentración, más color mayor la concentración del producto en los pocillos de la fila y columna.

Se estudiaron un total de 80 combinaciones de AMB-AE-cepa. En base a los $FCI_{\text{índice}}$ obtenidos (Tabla 13 y Figura 23), no se detectó efecto antagonista en ninguno de los ensayos. Los mejores valores se obtuvieron con la gentamicina, ya que se detectaron

Tabla 13. El índice de la Fracción de la Concentración Inhibitoria ($FCI_{\text{índice}}$), las CMI's solas y en combinación de los antibióticos convencionales y AEs.

	Cepas	Canela					Orégano					Tomillo vulgar				Tomillo rojo			
		CMI _{AMB}	CMI ^C _{AMB}	CMI _{AE}	CMI ^C _{AE}	FCI _{índice}	CMI ^C _{AMB}	CMI _{AE}	CMI ^C _{AE}	FCI _{índice}	CMI ^C _{AMB}	CMI _{AE}	CMI ^C _{AE}	FCI _{índice}	CMI ^C _{AMB}	CMI _{AE}	CMI ^C _{AE}	FCI _{índice}	
Gentamicina	P 1/7	32,0	4,00	625,0	312,5	0,625	2,00	312,5	156,25	0,563	4,00	312,5	156,25	0,625	2,00	312,5	156,25	0,563	
	3144	64,0	16,0	625,0	156,25	0,50	8,00	312,5	78,125	0,375	16,0	312,5	78,125	0,50	8,00	312,5	78,125	0,375	
	40/03	64,0	16,0	625,0	312,5	0,75	32,0	156,25	78,125	1,00	32,0	156,25	78,125	1,00	16,00	156,25	78,125	0,75	
	160/03	64,0	16,0	625,0	312,5	0,75	16,0	156,25	78,125	0,75	4,00	312,5	156,25	0,563	8,00	312,5	78,125	0,375	
	8010	32,0	4,00	625,0	312,5	0,625	4,00	156,25	78,125	0,625	4,00	312,5	78,125	0,375	4,00	156,25	78,125	0,625	
Oxitetraciclina	123/11	64,0	16,0	625,0	312,5	0,75	32,0	312,5	156,25	1,00	16,0	312,5	156,25	0,75	32,0	312,5	156,25	1,00	
	3144	32,0	8,00	625,0	156,25	0,50	32,0	312,5	78,125	1,25	16,0	312,5	156,25	1,00	32,0	312,5	78,125	1,25	
	10/06	32,0	2,00	1250	312,5	0,313	8,00	312,5	156,25	0,75	8,00	625,0	312,5	0,75	8,00	312,5	156,25	0,75	
	6217	64,0	8,00	625,0	312,5	0,625	64,0	156,25	39,06	1,25	2,00	312,5	156,25	0,531	8,00	312,5	156,25	0,625	
	8010	16,0	0,50	625,0	312,5	0,531	0,50	156,25	78,125	0,531	4,00	312,5	156,25	0,75	8,00	156,25	78,125	1,00	
Penicilina	123/11	1,00	0,063	625,0	312,5	0,563	0,063	312,5	156,25	0,563	0,25	312,5	312,5	1,25	0,125	312,5	312,5	1,125	
	3144	1,00	0,063	625,0	312,5	0,563	0,125	312,5	156,25	0,625	0,125	312,5	156,25	0,625	0,25	312,5	156,25	0,75	
	226/03	4,00	4,00	312,5	78,125	1,25	4,00	156,25	39,06	1,25	0,25	312,5	156,25	0,56	0,125	156,25	156,25	1,03	
	6217	8,00	8,00	625,0	156,25	1,25	1,00	156,25	156,25	1,125	1,00	312,5	156,25	0,63	4,00	312,5	156,25	1,00	
	273/12	4,00	4,00	625,0	156,25	1,25	2,00	312,5	156,25	1,00	0,031	312,5	312,5	1,008	0,031	312,5	312,5	1,008	
Trimetoprima-sulfametoxazol	123/11	64,0	8,00	625,0	625,0	1,125	64,0	312,5	78,125	1,25	64,0	312,5	78,125	1,25	64,0	312,5	78,125	1,25	
	3144	64,0	32,00	625,0	312,5	1,00	64,0	312,5	78,125	1,25	64,0	312,5	78,125	1,25	64,0	312,5	78,125	1,25	
	10/06	128,0	128,00	1250	625,0	1,50	128,0	312,5	78,125	1,25	1,00	625,0	312,5	0,51	128,0	312,5	78,125	1,25	
	6217	128,0	32,00	625,0	312,5	0,75	128,0	156,25	39,06	1,25	128,0	312,5	78,125	1,25	32,00	312,5	156,25	0,75	
	8010	64,0	64,0	625,0	312,5	1,25	64,0	156,25	39,06	1,25	0,25	312,5	156,25	0,504	64,0	156,25	78,125	1,50	

Efecto sinérgico en negrita. CMI_{AMB} , Concentración Mínima Inhibitoria de los antimicrobianos convencionales solos; CMI^C_{AMB} , Concentración Mínima Inhibitoria de los antimicrobianos convencionales en combinación; CMI_{AE} , Concentración Mínima Inhibitoria de los AEs solos; CMI^C_{AE} , Concentración Mínima Inhibitoria de los AEs en combinación.

sinergias ($FCI_{\text{índice}} 0,375-0,5$) y aditividad ($FCI_{\text{índice}} 0,563-1,0$) con los cuatro aceites esenciales. La sinergia se asoció en todos los casos con una reducción de 4 y 8 veces la concentración efectiva del antibiótico y de 4 veces la CMI de los AEs. En las combinaciones con efecto aditivo, la concentración efectiva de gentamicina para inhibir el crecimiento bacteriano se redujo de 2 a 16 veces (con orégano, tomillo común y tomillo rojo), si bien la CMI del AE sólo bajo a la mitad (Tabla 13).

En el caso de la oxitetraciclina, sólo se observó sinergia con la canela (2 de 5 ensayos, $FCI_{\text{índice}} 0,313$ y $0,5$), predominando un efecto aditivo con el resto de AEs. Como consecuencia del sinergismo se produjo una disminución en la CMI de la oxitetraciclina de hasta 16 veces y de 4 veces en la CMI de la canela. Se hallaron, asimismo, tres combinaciones aditivas muy próximas a la sinergia ($FCI_{\text{índice}} 0,531$) con una reducción de 32 veces la concentración efectiva del AMB y a la mitad del AE (canela, orégano y tomillo vulgar).

La combinación de penicilina o trimetoprim-sulfametoxazol con los aceites esenciales mostró efectos aditivos ($0,5 < FCI_{\text{índice}} \leq 1$) o indiferentes ($1 < FCI_{\text{índice}} \leq 2$).

Para ambos antimicrobianos, la mayor potenciación se produjo al combinarlos con tomillo común, con una reducción en su CMI de 128 y 256 veces, respectivamente. En estos casos, la concentración efectiva de aceite solo se redujo a la mitad.

La combinación de penicilina o trimetoprim-sulfametoxazol con los aceites esenciales mostró efectos aditivos ($0,5 < FCI_{\text{índice}} \leq 1$) o indiferentes ($1 < FCI_{\text{índice}} \leq 2$). Para ambos antimicrobianos, la mayor potenciación se produjo al combinarlos con tomillo común, con una reducción en su CMI de 128 y 256 veces, respectivamente. En estos casos, la concentración efectiva de aceite solo se redujo a la mitad.

El estudio de interacción de los AMBs con los PCs (Tabla 14 y Figura 23) incluyó 60 combinaciones. No se detectó efecto antagonista, si bien sólo se observó efecto sinérgico en la combinación de gentamicina y timol ($FCI_{\text{índice}}=0,5$), con una reducción de 4 veces en la CMI de ambos productos. Sin embargo, la mayor disminución en la concentración efectiva de antimicrobiano (8 veces la CMI) se obtuvo en ensayos con aditividad entre gentamicina-timol, gentamicina-carvacrol y oxitetraciclina-cinamaldehído ($FCI_{\text{índice}} = 0,625$), aunque la CMI del PCL en estos casos sólo se redujo a la mitad.

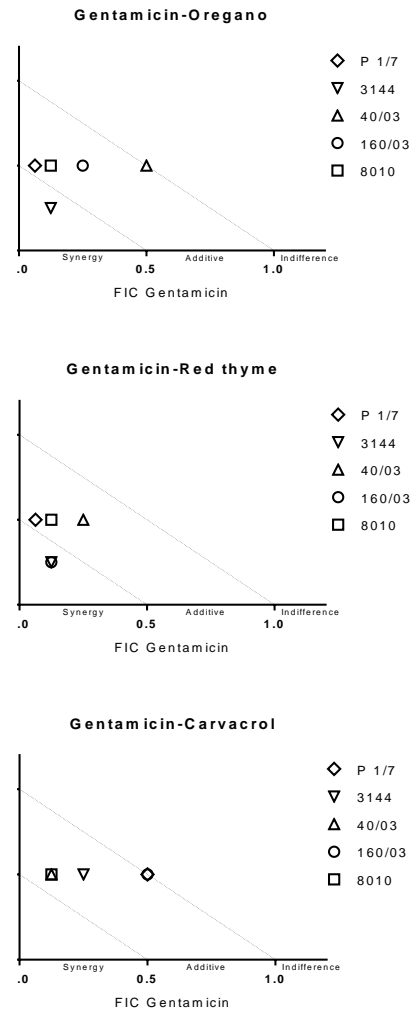
Tabla 14. El índice de la Fracción de la Concentración Inhibitoria ($FCI_{\text{índice}}$), las CMI's solas y en combinación de los AMB y los principales componentes.

		Cinamaldehído					Timol					Carvacrol			
	Cepas	CMI _{AMB}	CMI ^C _{AMB}	CMI _{PC}	CMI ^C _{PC}	FCI _{índice}	CMI ^C _{AMB}	CMI _{PC}	CMI ^C _{PC}	FCI _{índice}	CMI ^C _{AMB}	CMI _{PC}	CMI ^C _{PC}	FCI _{índice}	
Gentamicina	P 1/7	32,0	2,0	312,5	156,25	0,56	8,0	156,25	78,125	0,75	16,0	156,25	78,125	1,00	
	3144	64,0	32,0	312,5	156,25	1,00	8,0	156,25	78,125	0,625	16,0	156,25	78,125	0,75	
	40/03	64,0	64,0	156,25	39,06	1,25	16,0	156,25	39,06	0,50	8,0	156,25	78,125	0,625	
	160/03	64,0	64,0	156,25	39,06	1,25	8,0	156,25	78,125	0,625	32,0	156,25	78,125	1,00	
	8010	32,0	8,0	312,5	78,125	0,75	8,0	156,25	39,06	0,50	4,0	156,25	78,125	0,625	
Oxitetraciclina	123/11	64,0	32,0	312,5	156,25	1,00	32,0	156,25	78,125	1,00	64,0	156,25	39,06	1,25	
	3144	32,0	4,0	312,5	156,25	0,625	32,0	156,25	39,06	1,25	32,0	156,25	39,06	1,25	
	10/06	32,0	4,0	312,5	156,25	0,625	16,0	156,25	78,125	1,00	16,0	156,25	78,125	1,00	
	6217	64,0	16,0	156,25	78,125	0,75	32,0	156,25	78,125	1,00	64,0	156,25	39,06	1,25	
	8010	16,0	4,0	312,5	156,25	0,75	8,0	156,25	78,125	1,00	16,0	156,25	39,06	1,25	
Penicilina	123/11	1,00	0,5	312,5	156,25	1,00	0,5	156,25	78,125	1,00	1,0	156,25	39,06	1,25	
	3144	1,00	1,0	312,5	78,125	1,25	0,5	156,25	78,125	1,00	0,5	156,25	78,125	1,00	
	226/03	4,00	4,0	312,5	78,125	1,25	4,0	156,25	39,06	1,25	4,0	156,25	39,06	1,25	
	6217	8,00	4,0	156,25	78,125	1,00	8,0	156,25	39,06	1,25	8,0	156,25	39,06	1,25	
	273/12	4,00	4,0	312,5	78,125	1,25	4,0	156,25	39,06	1,25	4,0	156,25	39,06	1,25	
Trimetoprima-sulfametoxazol	123/11	64,0	16,0	312,5	156,25	0,75	64,0	156,25	39,06	1,25	64,0	156,25	39,06	1,25	
	3144	64,0	16,0	312,5	156,25	0,75	16,0	156,25	78,125	0,75	32,0	156,25	78,125	1,00	
	10/06	128,0	128,0	312,5	78,125	1,25	64,0	156,25	78,125	1,00	128,0	156,25	39,06	1,25	
	6217	128,0	128,0	156,25	39,06	1,25	128,0	156,25	39,06	1,25	128,0	156,25	39,06	1,25	
	8010	64,0	64,0	312,5	78,125	1,25	64,0	156,25	39,06	1,25	64,0	156,25	39,06	1,25	

Efecto sinérgico en negrita. CMI_{AMB} , Concentración Mínima Inhibitoria de los antimicrobianos convencionales solos; CMI_{AMB}^C , Concentración Mínima Inhibitoria de los antimicrobianos convencionales en combinación; CMI_{PC} , Concentración Mínima Inhibitoria de los principales componentes solos; CMI_{PC}^C , Concentración Mínima Inhibitoria de los principales componentes en combinación.

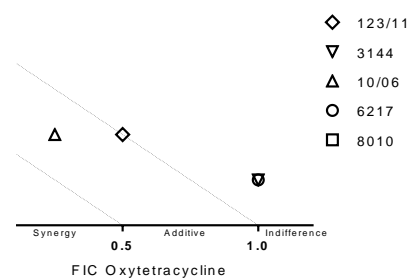
Figure 23: Isobologramas ilustrando el efecto sinérgico ($FCI_{\text{índice}} \leq 0,5$), Aditividad ($0,5 < FCI_{\text{índice}} \leq 1$) y Indiferencia ($1 < FCI_{\text{índice}} < 2$) de los aceites esenciales o sus componentes principales y antimicrobianos convencionales frente a cepas resistente de *Streptococcus suis*. (a) Gentamicina; (b) Oxitetraciclina; (c) Penicilina; (d) Trimetoprima-Sulfametoxazol.

(a)

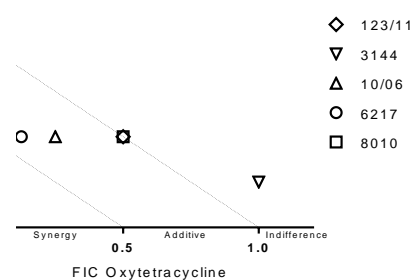


(b)

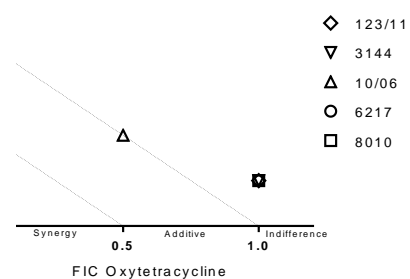
Oxytetracycline-Oregano



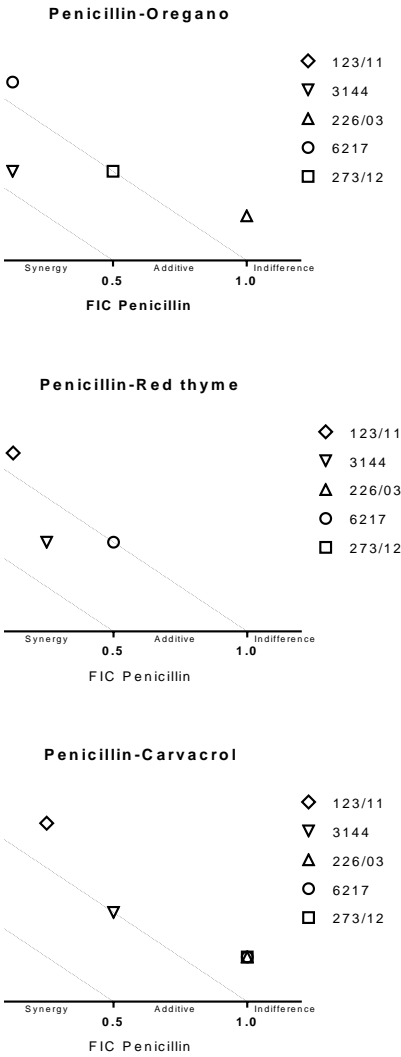
Oxytetracycline-Red thyme



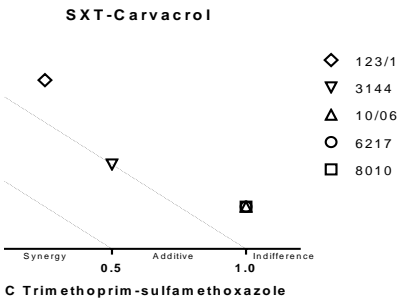
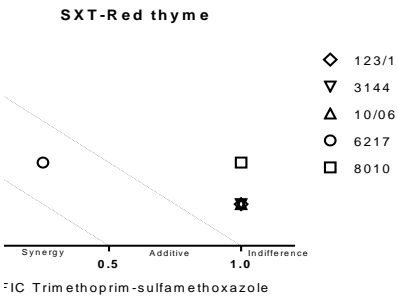
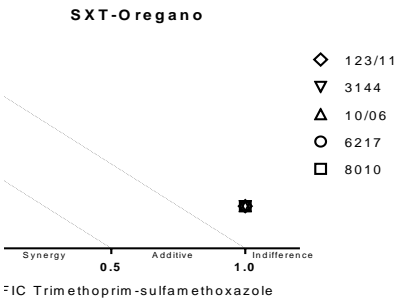
Oxytetracycline-Carvacrol



(c)



(d)



La combinación de SXT o penicilina con los componentes activos resultó generalmente en indiferencia ($FCI_{\text{índice}} = 1,25$), si bien en algunos casos se observó efecto aditivo ($FCI_{\text{índice}} = 0,75$) al combinar trimetoprim-sulfametoxazol y cinamaldehído o timol, con una reducción en la concentración efectiva de antimicrobiano de 4 veces la CMI.

En general, los AMB combinados con AEs mostraron mejores resultados que los AMB combinados con los componentes activos de dichos AEs.

Discusión

El uso extensivo de los antimicrobianos en medicina veterinaria es considerado una de las principales causas de la emergencia y difusión de microorganismos resistentes (Varela, 2013; De Jong *et al.*, 2014). Estudios recientes sobre el nivel de resistencia de importantes patógenos respiratorios del cerdo, incluido *S. suis*, han alertado sobre un notable descenso de la susceptibilidad de esta bacteria a diversos antimicrobianos de uso habitual en ganadería, como las tetraciclinas (de Jong *et al.*, 2014; El Garch *et al.*, 2016). En un intento por reducir este grave problema para la salud pública y la sanidad animal, el Parlamento Europeo establecía en 2011 un Plan de Acción para reducir el riesgo de emergencia de resistencia bacteriana, en el que se incluían medidas para promover la búsqueda de nuevos antimicrobianos (EC, 2013).

Los aceites esenciales son productos naturales, con demostradas propiedades antimicrobianas; su carácter hidrófobo y su compleja composición química les permite penetrar a través de las membranas celulares desarrollando múltiples mecanismos de acción que afectan a la supervivencia bacteriana (Goñi *et al.*, 2009). Esta característica es descrita por muchos autores como una ventaja frente a los antimicrobianos tradicionales, ya que al tener varios sitios diana se dificultaría el desarrollo de resistencias bacterianas (Nazzaro *et al.*, 2013; Langeveld *et al.*, 2014; O'Brien *et al.*, 2015; Knezevic *et al.*, 2016). De igual modo, su complejidad química podría explicar la potenciación de los antimicrobianos descrita en trabajos previos con numerosas bacterias de interés en salud pública y sanidad animal (*Salmonella* spp., *E. coli* o *Staphylococcus aureus*) (Palaniappan y Holley, 2010; Solarte *et al.*, 2017).

En el caso del género *Streptococcus* spp., los estudios realizados con patógenos orales y del aparato respiratorio han sugerido el potencial de diversos aceites (anís, orégano, clavo) y principios activos (eugenol, timol, carvacrol, cinamaldehído) para reducir la resistencia bacteriana a diversos antimicrobianos (Palaniappan y Holley, 2010; Moon *et al.*, 2011; Gradinaru *et al.*, 2014; Magi *et al.*, 2015). Sin embargo, se sabe poco sobre la eficacia de estos productos naturales, solos o combinados con antimicrobianos tradicionales, para el control de las infecciones por *S. suis*.

Al igual que en estudios previos realizados en otros países europeos, la caracterización del perfil antimicrobiano de las cepas incluidas en esta Tesis mostró los mayores porcentajes de resistencia para tetraciclinas, trimetoprim-sulfametoxazol y aminoglucósidos (Vela *et al.*, 2005; Wisselink *et al.*, 2006; El Garch *et al.*, 2016). Detectamos, sin embargo, un importante nivel de resistencia a penicilina, en comparación con estos estudios.

La interacción de los AEs y sus componentes activos con los antimicrobianos tradicionales se valoró mediante el método de checkerboard, obteniendo para algunos antimicrobianos y cepas valores de CMI diferentes a los hallados en el test de susceptibilidad individual. Sin embargo, esta variación no influyó en los resultados de la prueba de interacción, por cuanto el índice FCI se estimó a partir de las CMIs individuales y combinadas obtenidas en el mismo ensayo (Fratini *et al.*, 2017).

Se observó sinergismo, aditividad e indiferencia, pero no se detectó ningún caso de antagonismo. De todas las combinaciones analizadas, los mejores resultados se obtuvieron para la gentamicina y los cuatro aceites esenciales, ya que en todos los casos se detectó sinergia para al menos una de las cepas ensayadas de *S. suis*. Estos resultados podrían ser de interés para futuras opciones de tratamiento combinado de este antibiótico con aceites esenciales contra enfermedades producidas por especies de *Streptococcus* (EUCAST, 2009; CLSI, 2013). La combinación oxitetraciclina-canela mostró sinergia para 2 de las 5 cepas y aditividad con las tres restantes. Esta interacción también se ha observado en estudios previos con *Salmonella enterica*, un patógeno alimentario importante (Bassole y Juliani, 2012; Solarte *et al.*, 2017).

La combinación de los cuatro AMB con un AE dio como resultado la disminución de la concentración efectiva del AMB, de 4 a 256 veces de la CMI, para casi todas las cepas de *S. suis*. Los mejores resultados se obtuvieron siempre al

combinar el AMB con canela o tomillo (rojo o común). Esta interacción positiva, de sinergismo o aditividad, también supuso una disminución en la CMI del AE a dosis con efecto citotóxico reducido (Dušan *et al.*, 2006; Fabio *et al.*, 2007).

En este trabajo, también se evaluó la combinación de los AMBs convencionales con los componentes activos principales (cinamaldehído, timol o carvacrol), para determinar si tenían un efecto similar al de los AEs. La potenciación de los AMB fue menor en frecuencia y medida: solo se detectó sinergia para la combinación gentamicina-timol (2/5 cepas) y la reducción de la concentración efectiva de los AMB fue sólo de 2x a 8x CMI. Destacar, sin embargo, que la concentración final efectiva de los principios activos fue generalmente inferior a la del aceite esencial, lo que permitiría reducir aún más el daño celular (Dušan *et al.*, 2006; Fabio *et al.*, 2007).

Esta diferencia observada en la capacidad de potenciación de un mismo antimicrobiano por los aceites esenciales y sus componentes activos, podría estar debida a diferencias en la solubilidad y/o volatilidad de estos productos, o la mayor actividad del AE como consecuencia de los múltiples mecanismos de acción desarrollados por sus principios activos y el sinergismo existente entre ellos (Rota *et al.*, 2004; Padalia *et al.*, 2015; Said *et al.*, 2015).

Los mecanismos moleculares responsables de la sinergia entre antimicrobianos y productos naturales no son del todo conocidos, proponiéndose diferentes hipótesis: rendimiento en diferentes sitios objetivo, suma de varios mecanismos de acción (disminución de la permeabilidad de la membrana celular, degradación enzimática o modificación del fármaco) y/o inhibición por el producto natural de la bomba de expulsión antimicrobiana activa (Hemaiswarya *et al.*, 2008; Bassole y Juliani, 2012; Magi *et al.*, 2015).

Capítulo 8

Discusión general

Discusión general

Los servicios de sanidad animal representan un componente esencial en la política socioeconómica, en la producción de alimentos, así como de la salud pública de un país. Un servicio eficaz de sanidad animal debe, ante todo, contribuir a reducir las pérdidas alimentarias debidas a la mortalidad y morbilidad animal, incrementar la productividad y rendimientos de los rebaños, además de proteger la salud humana contra las enfermedades zoonóticas (FAO, 2017). Es sabido que la salud animal, la salud humana y la salud del ecosistema están fuertemente vinculadas y, en este contexto, ha surgido el concepto de “Un mundo, una salud” que promueve la toma de conciencia colectiva mediante la mejora de la cooperación entre médicos, veterinarios, otros profesionales de la salud científica y ambiental. Una de sus misiones es la toma de esfuerzos conjuntos en el desarrollo y evaluación de nuevos métodos de diagnóstico, medicamentos y vacunas para la prevención y el control de enfermedades en todas las especies (OMS, 2017). La búsqueda de alternativas antimicrobianas es uno de los principales desafíos en Sanidad Animal, que debería ser afrontada en colaboración con todos los profesionales de la salud.

Somos conscientes del escepticismo que todavía existe en el mundo científico y profesional hacia los aceites esenciales y sus componentes, y que es difícil que sustituyan totalmente a los antimicrobianos. Sin embargo, consideramos que pueden constituir una alternativa eficaz al problema de la resistencia bacteriana como prebióticos o potenciadores de los antibióticos tradicionales. Con esta hipótesis se planteó el primer objetivo de esta Tesis, seleccionar diversos aceites esenciales con actividad frente a *S. suis* a fin de estudiar su acción antimicrobiana y la de sus principales componentes. Los resultados, similares a los obtenidos para otros patógenos del cerdo responsables de importantes pérdidas económicas, como *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*, (Burt *et al*, 2005; Dušan *et al*, 2006; Solarte *et al*, 2018), apoyan su uso en la producción porcina.

El potencial de estos productos naturales radica en su carácter hidrófobo y, en el caso de los aceites esenciales, en su compleja composición química, en base a la cual estos productos son capaces de introducirse a través de la membrana celular y mitocondrial y desarrollar diversos mecanismos que afectan a la supervivencia bacteriana (Goñi *et al*, 2009). Algunos autores han sugerido que ésta podría ser la causa de que no se hayan descrito subpoblaciones bacterianas resistentes a los aceites esenciales

(Knezevic *et al* 2016), resultando una opción interesante para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias multirresistentes.

Sin embargo, como muchos fármacos, los aceites esenciales y sus principios activos muestran un efecto citotóxico dosis dependiente descrito como un aumento de la apoptosis y la necrosis celular (Dušan *et al.*, 2006, Fabio *et al.*, 2007). La CMI₉₀ y la CMB₉₀ halladas en nuestro trabajo están próximas o por encima de las dosis citotóxicas descritas por diversos autores (Dušan *et al.*, 2006; Fabio *et al.*, 2007; Llana-Ruiz-Cabello *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2017; Belato *et al.*, 2018), sin embargo, Dušan y cols (2006) refieren que, en caso de administración oral, la regeneración natural del epitelio intestinal podría reparar el aumento de las lesiones celulares inducida por estas sustancias. En el tercer objetivo de nuestra Tesis comprobamos, además, que la terapia combinada de los antimicrobianos tradicionales con los aceites esenciales o sus principales componentes, podría constituir una alternativa eficaz para reducir la dosis de ambos productos y potencializar sus efectos.

Por otra parte, es preciso recordar que la actividad *in vitro* de un antimicrobiano no siempre se corresponde con su eficacia *in vivo*. Es posible que, como consecuencia de la dilución y absorción del fármaco en estómago, intestino y sangre, la concentración inhibitoria alcanzada en el foco de infección por el constituyente activo de muchos antimicrobianos sea sólo 1/20 o menos de la dosis inicial (Lahlou *et al.*, 2004). La información aportada por los estudios de susceptibilidad antimicrobiana debe considerarse, para ello, desde una perspectiva farmacológica a fin de diseñar las pautas de uso más eficaces. Sin embargo, las investigaciones sobre la farmacocinética y farmacodinamia de los aceites esenciales se encuentran limitadas por su compleja composición química.

Los estudios *in vivo* en cerdos con orégano, tomillo y canela describen generalmente un aumento significativo en el rendimiento del crecimiento sin alterar la calidad de la canal (Namkung *et al.*, 2004; Simitzis *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha observado una notable diferencia en el efecto productivo de los AEs según la cantidad agregada al alimento y factores intrínsecos y extrínsecos, como la edad, el pH gástrico, el estado nutricional, la dieta, T^a7H^a o el carácter volátil de estos productos aromáticos (Simitzis *et al.*, 2010). Para subsanar este problema, las investigaciones actuales se dirigen a su administración en capsulas blandas de gelatina, que además de facilitar la

administración vía oral, la dosificación exacta, protección contra factores ambientales y enmascarar los sabores u olores desagradables, tiene bajo coste y favorece la llegada y absorción en todo el tracto gastrointestinal, ya que ha sido comprobado que algunos de los principales componentes son absorbidos rápidamente en el aparato digestivo de los lechones (Michiels *et al*, 2008).

Consideramos que los resultados de esta Tesis Doctoral apoyan el potencial de los AEs y sus principales componentes como una alternativa eficaz, solos o en combinación con los AMBs comúnmente usados en las grajas porcinas, para el control de las infecciones por *Streptococcus suis* y como estrategia para disminuir el desarrollo de nuevas resistencias bacterianas. No obstante, es preciso ampliar los estudios *in vitro* a más cepas resistentes y completarlo con investigaciones *in vivo* sobre los mecanismos de acción, factores intrínsecos y extrínsecos y posible toxicidad.

Capítulo 9

Conclusiones/Conclusions

Conclusiones

1. El estudio cualitativo destacó el fuerte potencial inhibidor del tomillo rojo, tomillo vulgar y orégano frente a *S. suis*, tanto por contacto como por acción vapor. En el caso de canela, menta y clavo, la actividad por contacto fue moderada, mientras que romero y albahaca mostraron una débil inhibición. La actividad de estos aceites por vapor fue generalmente tenue o nula.
2. En base a los valores CMI₅₀₋₉₀ estimados, carvacrol y timol mostraron la mayor actividad inhibitoria (156.25 µg/ml) frente a *S. suis*, seguidos del orégano, tomillo vulgar, tomillo rojo y cinamaldehído (312.5nµg/ml), y por último, la canela (CMI_{50y90} 625 y 1250 µg/ml). Se demostró el carácter bactericida de todos los productos ensayados basados en su índice microcida. Asimismo, se comprobó una actividad inhibitoria y bactericida significativamente mayor ($P < 0.05$) del principio activo en comparación con el aceite esencial.
3. Los ensayos de curva de letalidad comprobaron, para todos los productos ensayados, que la actividad antimicrobiana fue dependiente de la concentración. Asimismo, mostró en todos los casos, excepto para el cinamaldehído, un rápido efecto bactericida a dosis supra-inhibitorias ($>CMI$), logrando la erradicación virtual de la población bacteriana tras 1-5 minutos de exposición.
4. La interacción positiva observada entre los antimicrobianos seleccionados, especialmente la gentamicina y la oxitetraciclina, y los aceites esenciales o sus principios activos, apoyaría su uso combinado para el control de las infecciones por *S. suis*, con una notable reducción en la dosis de administración y los efectos adversos de ambos productos.

Conclusions

1. The qualitative study highlighted the strong inhibitory potential of red thyme, common thyme and oregano oils against *S. suis*, by contact and vapour action. In the case of cinnamon, mint and clove, the inhibitory effect after contact was moderate, while rosemary and basil showed weak inhibition. The activity of these oils by vapour was generally tenuous or no existent.
2. Based on the estimated MIC₅₀₋₉₀ values, carvacrol and thymol showed the highest inhibitory activity (156.25 µg/mL) against *S. suis*, followed by oregano, common thyme, red thyme and cinnamaldehyde (312.5 µg/mL), and finally, cinnamon (CMI₅₀₋₉₀ 625 and 1250 µg/ml). The bactericidal character of all tested products based on their microcidal index was demonstrated. A significantly ($P<0.05$) higher inhibitory and bactericidal activity of the main components compared with the essential oil was found.
3. The time-kill curve tests proved, for all tested products, that the antimicrobial activity was dependent on concentration. It showed in all cases, except for cinnamaldehyde, a rapid bactericidal effect at supra-inhibitory doses ($>CMI$), achieving virtual eradication of the bacterial population after 1-5 minutes of exposure.
4. The positive interaction observed between conventional antimicrobials, such as gentamicin and oxytetracycline, and essential oils, such as cinnamon, oregano or thyme (common and red), would support their combined use for the control of *S. suis* diseases in pig farms with an important reduction in effective dose of both products.

Capítulo 10

Resumen/Summary

Resumen

Streptococcus suis es una bacteria Gram positiva asociada con una amplia variedad de enfermedades en los cerdos, como meningitis, artritis, bronconeumonía, endocarditis, poliserositis y septicemia. Además, es un agente zoonótico emergente que causa infecciones graves en personas en contacto directo con porcinos infectados. Hoy en día, el control se basa fundamentalmente en el tratamiento con antimicrobianos e implementación de medidas sanitarias en la granja afectada. Se ha sugerido que *S. suis* puede ser responsable de la propagación de genes de resistencia a patógenos humanos importantes como *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus agalactiae*.

El uso extensivo de antimicrobianos en medicina veterinaria se considera una de las principales causas de la aparición y propagación de microorganismos resistentes. De este modo, la Unión Europea prohibió el uso de antimicrobianos como promotores del crecimiento animal (Comisión Europea, 1831/2003). Una de las estrategias propuestas para la reducción es el uso de aceites esenciales (AE) solos o combinados con agentes antimicrobianos (AMB). Los aceites esenciales son extractos de plantas obtenidos por destilación al vapor y compuestos por una combinación de terpenos, aldehídos y alcoholes, muchos de los cuales son volátiles. La actividad de los AE depende de la concentración de los componentes principales, las partículas presentes en las trazas y la distribución del aceite en las bacterias, lo que determina el tipo de reacción y la respuesta biológica inducida. La acción antimicrobiana incluye la inhibición de una vía bioquímica común, la inactivación de las enzimas microbianas, la filtración de la membrana celular y el aumento de la permeabilidad de la membrana.

La investigación de esta tesis doctoral consiste en evaluar el potencial de varios aceites esenciales y sus principales componentes activos como alternativas antimicrobianas contra *Streptococcus suis*. El primer objetivo fue el estudio cualitativo del potencial antimicrobiano de ocho aceites esenciales contra las cepas de campo de *S. suis*, mediante la determinación de la zona de inhibición por contacto directo y gaseoso (método de difusión en disco y método de la placa de Petri invertida) y su comparación con el test ANOVA de medias repetidas. Los aceites con una actividad inhibitoria significativamente mayor fueron el tomillo rojo y el tomillo vulgar (\emptyset media de la zona

de inhibición 34,2 y 33,2 mm, respectivamente), seguido de orégano (\emptyset media de la zona de inhibición 29,4 mm). Canela, menta y clavo (\emptyset significa 16,5; 16,4 y 15,8 mm, respectivamente) mostraron un potencial antimicrobiano similar, aunque fue significativamente menor que los anteriores. Se obtuvo buena actividad de la fracción volátil de tomillo (rojo y común) y orégano (\emptyset medio 23,3–25,7 mm), mientras que se observó una débil o nula inhibición para menta, albahaca, romero, canela y clavo. Este es uno de los primeros estudios que selecciona AE con actividad antimicrobiana contra varias cepas de campo de *S. suis*. Los cuatro aceites con mayor potencial antimicrobiano en el ensayo de difusión en disco se seleccionaron para su estudio cuantitativo.

El segundo objetivo de la tesis fue evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales seleccionados y sus principales componentes activos (carvacrol, timol y cinamaldehído) contra 60 cepas de campo de *S. suis*, de origen humano y porcino. Mediante microdilución en caldo Infusión Cerebro Corazón (suplementado con un 0,15% de agar para facilitar la dilución de los aceites y la lectura de los resultados) se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y mínima bactericida (CMB). La relación del efecto concentración-tiempo fue determinada por la curva de muerte de los diferentes productos, para establecer la dinámica de su acción microcida. La susceptibilidad de todos los aislamientos de *S. suis* analizados en este estudio sugiere un comportamiento muy homogéneo de las cepas frente a los AEs y sus principios activos. Los resultados obtenidos demostraron el carácter bactericida de todos los productos ensayados (índice microcida = 1-2), confirmando el potencial antimicrobiano descrito para otras especies de *Streptococcus*. Los valores estimados para la CMI₉₀ y la CMB₉₀ destacaron especialmente la actividad del timol y carvacrol frente a los demás productos. Entre los aceites, los mejores resultados se observaron con el orégano y los tomillos. Todos los productos, excepto el cinamaldehído, mostraron una fuerte y rápida actividad, logrando la erradicación virtual (eficacia 99,99%) a dosis de 2 y 4 veces la CMI en sólo 1-5 minutos de exposición. En base a los resultados obtenidos, los productos ensayados en esta tesis tendrían carácter bactericida concentración-dependiente.

Como tercer y último objetivo, se evaluó el efecto de la combinación de los aceites esenciales seleccionados y sus principales componentes activos con los antimicrobianos utilizados habitualmente en las granjas porcinas. La prueba de tablero

de ajedrez (*checkerboard*) se usó como base para calcular el Índice de la Fracción de la Concentración Inhibitoria ($FCI_{\text{índice}}$), cuyos resultados se interpretaron en base a los criterios de la EUCAST (2000). No se detectó efecto antagonista entre los AEs y los antimicrobianos probados. La mayor potenciación positiva se obtuvo para la gentamicina, que mostró sinergismo (0,375-0,5) y aditividad (0,563-1,0) con los cuatro aceites esenciales. En el caso de la oxitetraciclina, los mejores resultados se obtuvieron al combinarla con canela: efecto sinérgico en 2/5 ensayos (0,313 y 0,5, respectivamente) y efecto aditivo en los demás AE. La combinación de penicilina o trimetoprim-sulfametoxazol con los aceites esenciales mostró aditividad o indiferencia. El estudio de la interacción entre antimicrobianos y principios activos tampoco mostró efecto antagónico, si bien sólo se observó sinérgismo entre la gentamicina y el timol ($FCI_{\text{índice}} = 0,5$), con una reducción de 4 veces en la CMI de ambos productos. En general, los AMB combinados con AE mostraron mejores resultados que los AMB combinados con los principios activos. Estas diferencias podrían explicarse por la variedad de mecanismos de acción atribuibles a la compleja composición de los aceites esenciales. La interacción positiva observada entre los antimicrobianos convencionales, como la gentamicina y la oxitetraciclina, y los aceites esenciales como la canela, el orégano o los tomillos (vulgar y rojo) respaldarían su uso combinado para el control de las enfermedades por *S. suis* en granjas porcinas con una importante reducción de la dosis efectiva de ambos productos.

Summary

Streptococcus suis is a Gram-positive bacterium associated with a wide variety of pig diseases, such as meningitis, arthritis, bronchopneumonia, endocarditis, polyserositis and septicemia. In addition, it is a zoonotic agent that causes severe infections in people related to infected pigs and is responsible for an increasing number of human infections. Nowadays, the control of this microorganism is based on antimicrobial treatment and sanitary measures implemented on the affected farms. It has also been suggested that *S. suis* may be responsible for the spread of resistance genes to important human pathogens as *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus agalactiae*.

The extensive use of antimicrobials in veterinary medicine is considered one of the main causes of the emergence and spread of resistant microorganisms. In order to reduce the use of antimicrobials in pig farming, the European Union banned their use as animal growth promoters (European Commission, 1831/2003). There is an important pressure to reduce the use of antimicrobials in pig farming worldwide, with the aim of avoiding the development of bacterial resistances. One of the strategies proposed for the control of these pathogens is the use of essential oils (EOs) alone or combined with antimicrobials agents (AMBs). Essential oils are extracts of plants obtained by steam distillation and composed by a combination of terpenes, aldehydes and alcohols, many of which are volatile. The activity of the EOs depends on the concentration of the main components, the particles present in the traces, and the distribution of the oil in the bacteria, which determines the type of reaction and the biological response induced. The antimicrobial action includes the inhibition of a common biochemical pathway, inactivation of microbial enzymes, leaking of cell membrane and increasing the membrane permeability.

The main goal of present PhD thesis is to assess, among natural products, the potential of various essential oils and their main active components as antimicrobial alternatives against *Streptococcus suis*. The first objective was the qualitative study of antimicrobial potential of eight essential oils against 20 field strains of *S. suis* by means of determination of inhibition halo after direct and gaseous contact. Selection of oils with greatest antimicrobial potential for their subsequent quantitative study. The

antibacterial inhibition was determined by the disk diffusion method. Furthermore, the effect of the volatile fraction of every EO was studied with the inverted Petri dish method. The antibacterial activity was evaluated by measuring in millimetres the diameter of the inhibitory zone. The repeated- measures ANOVA test was used for the selection of the four essential oils with the highest antimicrobial potential in the disk diffusion assay. The oils with a significantly higher inhibitory activity were red thyme and common thyme (\bar{X} mean of inhibition zone 34.2 and 33.2 mm, respectively), followed by oregano (\bar{X} mean of inhibition zone 29.4 mm). Cinnamon, peppermint, and clove (\bar{X} mean 16.5, 16.4, and 15.8 mm, respectively) showed a similar antimicrobial potential, although it was significantly lower than the previous ones. Good activity was obtained from the volatile fraction of thyme (red and common) and oregano (\bar{X} mean 23.3–25.7 mm), whereas a limited or absent inhibition was observed for peppermint, basil, rosemary, cinnamon, and clove. This is one of the first studies that selects EOs with antimicrobial activity against several field *S. suis* strains.

The second objective was to evaluate the antimicrobial activity of the selected essential oils (oregano, red thyme, common thyme and cinnamon) and their main active components (carvacrol, thymol and cinnamaldehyde) against 60 field strains of *S. suis*, of human and porcine origin. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) were performing using the broth dilution method, and to facilitate the dilution of the oils and the reading of the results Brain-Heart Infusion broth supplemented with 0.15% agar was used. The concentration-time-effect relationship was determined by the time-kill curve of different products, to establish the dynamics of their microcidal action. The susceptibility of all the *S. suis* isolates analysed in this study suggested a very homogeneous behaviour of the strains against the analysed products. The results obtained demonstrated the bactericidal character of all the products tested (microcidal index = 1-2), confirming the antimicrobial potential described by other researches. The estimated values for the MIC₉₀ and MBC₉₀ emphasized the activity of thymol and carvacrol compared with the other products. Among these oils, the best results were observed for oregano and both thymes. All products, except cinnamaldehyde, showed a strong and rapid antimicrobial activity, achieving virtual eradication (99.99% efficiency) at doses of 2 and 4 fold the MIC in 1-5 minutes of exposure. Basing on the results obtained in time-kill curve, the

products tested in this thesis would have a concentration-dependent bactericidal character.

As a third and final objective of this Doctoral Thesis, we assessed the effect of the combination of selected essential oils and their main active components with the conventional antimicrobials commonly used in the control of infections in pigs. The checkerboard test was used to calculate a Fractional Inhibitory Concentration Index (FIC_{Index}) and the results were interpreted according to EUCAST (2000). No antagonist effect was detected. The best FIC values were obtained with gentamicin, since synergy (FIC_{index} 0,375-0,5) and additive effect (FIC_{index} 0.563-1.0) were detected with the four essential oils. For oxytetracycline, the best results were obtained in the interaction with cinnamon, with synergistic effect in 2/5 assays (FIC_{index} 0.313 and 0.5, respectively) and additive effect in its interaction with the remaining EOs. The combination of penicillin or trimethoprim-sulfamethoxazole with the essential oils showed additive or indifferent effects. The study of the interaction of antimicrobials with active ingredients included 60 combinations. No antagonistic effect was detected, although only a synergistic effect was observed when combined gentamicin and thymol ($FIC_{index} = 0.5$), with a 4-fold reduction in the MIC of both products. In general, the combination of AMBs with EOs showed better results than the combination of AMBs with the main components of EOs. These differences could be explained by the variety of mechanisms of action attributable to the Essential Oil compounds and the possible synergism between them. The positive interaction observed between conventional antimicrobials, as gentamicin and oxytetracycline, and essential oils as cinnamon, oregano or thyme (common and red) would support their combined use for the control of *S. suis* diseases in pig farms with an important reduction in effective dose of both products.

Capítulo 11

Agradecimientos

Agradecimientos

La vivencia y conocimiento que adquirí durante esta tesis, ya no hacen de mí la misma que ha llegado a España. Deseo agradecer en este apartado a las personas que me han hecho mejor profesional al compartir conmigo su amistad y experiencias.

Me gustaría agradecer infinitamente a mi tutora, Dra. Belén Huerta Lorenzo, por todo su tiempo, paciencia, cariño y dedicación. Gracias por haber confiado en mí y regalarme su conocimiento. Su inteligencia y experiencia son fuente de inspiración.

Mis agradecimientos a los profesores del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Córdoba, Dra. M^a Carmen Tarradas, Dra. Inmaculada Luque, Dr. Rafael Astorga y Dr. Alfonso Maldonado. Gracias por vuestro cariño, consejos, enseñanza y disponibilidad a resolver a cualquier duda que se planteara.

Grazie mille a todos de la Unidad de Microbiología de la *Università Politecnica delle Marche* (Ancona, Italia), especialmente Dra. Bruna Facinelli, Dra. Gloria Magi y Dra. Emanuela Marini, por la oportunidad de realizar la estancia en Italia, por todo conocimiento aportado, atención y cariño.

En mi opinión, lo más bonito de la investigación es el intercambio de conocimiento. Asimismo, quiero agradecer a todos los compañeros que he tenido en el Departamento de Sanidad Animal, los cuales me han ayudado mucho en mi trabajo y en hacerlo más ameno.

Mi experiencia en otro continente me ha permitido valer de la amistad de personas especiales y que, mismo sin nombrarlas, sabrán que les dedico estas palabras. Estar lejos de mi hogar ni siempre ha sido fácil, sin embargo, mis amigos fueron mi familia, mis compañeros de viaje y aventuras, siempre dispuestos a ayudarme y apoyarme, hicieron de este periodo de mi vida algo extraordinario.

Por otra parte, quiero dedicar mis agradecimientos también a los amigos del “otro lado del charco”. El cariño y apoyo que me ha llegado desde lejos les hacen merecedores de estas palabras y de mi eterna gratitud.

Quisiera expresar mis agradecimientos a mi familia, pero palabras no son suficientes. El amparo incondicional concedido por ellos ha sido el pedestal en mi vida académica y profesional. La alegría y cariño que me enviaron las “*Balaquinhas*” y mis

sobrinos durante mi tesis, no permitieron que la distancia y la nostalgia me hicieran flaquear ante mis objetivos. Sin olvidar de agradecer, la educación y oportunidad que me han ofrecido mis padres, Almir y M^a de Lourdes.

Finalmente, agradecer a CAPES (*Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*) del Ministerio de Educación de Brasil, por la beca concedida, sin la cual no hubiese sido posible la realización de este trabajo.

Capítulo 12

Referencias bibliográficas

Referencias bibliográficas

- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de la resistencia a los antibióticos. Calle Campezo, 1, Edificio 8, Madrid. 2º edición, 2015.
- Ahmad, A., van Vuuren, S. and Viljoen, A. (2014) Unravelling the Complex Antimicrobial Interactions of Essential Oils - The Case of *Thymus vulgaris* (Thyme). *Molecules* 19, 2896-2910.
- Ait-Said, L., Zahlane, K., Ghalbane, I., El Messoussi, S., Romane, A., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. (2015). Chemical composition and antibacterial activity of *Lavandula coronopifolia* essential oil against antibiotic-resistant bacteria. *Natural Product Research*, 29(6), 582-585.
- Allan, P., & Bilkei, G. (2005). Oregano improves reproductive performance of sows. *Theriogenology*, 63(3), 716-721.
- Arends J. P. and H. C. Zanen. 1988. Meningitis caused by *S. suis* in humans. *Rev Infect Dis* 10(1): 131-137.
- Artuz, M. A., & Restrepo, H. (2002). El aborto inducido. Una visión histórica de su manejo. *Colombia Médica*, 33(2).
- Ayrle, H., Mevissen, M., Kaske, M., Nathues, H., Gruetzner, N., Melzig, M. and Walkenhorst, M. (2016) Medicinal plants - prophylactic and therapeutic options for gastrointestinal and respiratory diseases in calves and piglets? A systematic review. *Bmc Veterinary Research* 12.
- Bajpai, V.K., Baek, K.H. and Kang, S.C. (2012) Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. *Food Research International* 45, 722-734.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.
- Balaje, R. M., Sidhu, P. K., Kaur, G., & Rampal, S. (2013). Mutant prevention concentration and PK–PD relationships of enrofloxacin for *Pasteurella multocida* in buffalo calves. *Research in Veterinary Science*, 95(3), 1114-1124.
- Balouiri, M., Sadiki, M. and Ibsouda, S.K. (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6, 71-79.
- Bassole, I.H.N. y Juliani, H.R. (2012) Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules* 17, 3989-4006.
- Baums CG, Kock C, Beineke A, Bennecke K, Goethe R, Schröder C, Waldmann KH, Valentin-Weigand P. 2009. *Streptococcus suis* bacterin and subunit vaccine immunogenicities and protective efficacies against serotypes 2 and 9. *Clin Vaccine Immunol* 16(2):200-208.

- Becerril, R., Nerin, C. and Gomez-Lus, R. (2012) Evaluation of Bacterial Resistance to Essential Oils and Antibiotics After Exposure to Oregano and Cinnamon Essential Oils. *Foodborne Pathogens and Disease* 9, 699-705.
- Belato, K.K., de Oliveira, J.R., de Oliveira, F.S., de Oliveira, L.D. and Camargo, S.E.A. (2018) Cytotoxicity and genotoxicity of thymol verified in murine macrophages (RAW 264.7) after antimicrobial analysis in *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans*. *Journal of Functional Foods* 40, 455-460.
- Ben Arfa, A.; Combes, S.; Preziosi-Belloy, L.; (2006) Gontard, N.; Chalier, P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett. Appl. Microbiol.* 43,149–154.
- Ben Lagha, A., Haas, B., Gottschalk, M., & Grenier, D. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. *Vet Res*, 48, 22. <http://doi.org/10.1186/s13567-017-0425-6>
- Benga, L., Goethe, R., Rohde, M., Valentin-Weigand, P., (2004). Nonencapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells. *Cellular Microbiology* 6, 867–881.
- Berthelot-Hérault, F, Gottschalk, M., Labbé, A., Cariolet, R., & Kobisch, M. (2001). Experimental airborne transmission of *Streptococcus suis* capsular type 2 in pigs. *Veterinary microbiology*, 82(1), 69–80.
- Betancourt L, L., Ariza N, C., Diaz G, G. and Afanador T, G. (2012) Effect of different levels of essential oils of *Lippia origanoides* kunth in broiler chicken. *Revista Mvz Cordoba* 17, 3033-3040.
- Bilia, A. R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F., & Bergonzi, M. C. (2014). Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.
- Blume, V., I. Luque, A.I. Vela, C. Borge, A. Maldonado, L. Domínguez, C. Tarradas, J.F. Fernández-Garayzábal. 2009. Genetic and virulence-phenotype characterization of serotype 2 and 9 *Streptococcus suis* swine isolates in Spain. *Int Microbiol* 12(3):161-166.
- Burt, S. A., Vlieland, R., Haagsman, H. P., & Veldhuizen, E. J. (2005). Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157: H7 by addition of food stabilizers. *Journal of Food Protection*, 68(5), 919-926.
- Buhoi, A., Lebouguenec, C. and Horaud, T. (1989) Genetic-basis of antibiotic-resistance in *Aerococcus viridans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33, 529-534.
- Canut-Blasco, A., Calvo, J., Rodríguez-Díaz, J. C., & Martínez-Martínez, L. (2016). Informes acumulados de sensibilidad a los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(8), 524-530.

- Charland, N., Nizet, V., Rubens, C.E., Kim, K.S., Lacouture, S., Gottschalk, M., (2000). *Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Infection and Immunity* 68, 637–643.
- Cheng, T., Liang, J., He, J., Hu, X., Ge, Z. and Liu, J. (2017) A novel rhamnolipid-producing *Pseudomonas aeruginosa* ZS1 isolate derived from petroleum sludge suitable for bioremediation. *AMB Express* 7, 120.
- Clifton-Hadley, F.A., Alexander, T.J.L., Upton, I. and Duffus, W.P.H. (1984) Further studies on the subclinical carrier state of *Streptococcus suis* type 2 in pigs. *Veterinary Record* 114, 513-518.
- Chouhan, S., Sharma, K. and Guleria, S. (2017) Antimicrobial activity of some essential oils present status and future perspectives. *Medicines (Basel, Switzerland)* 4.
- Chovanová, R., Mezovská, J., Vavrková, Š., & Mikulášová, M. (2015). The inhibition the Tet (K) efflux pump of tetracycline resistant *Staphylococcus epidermidis* by essential oils from three *Salvia* species. *Letters in Applied Microbiology*, 61(1), 58-62.
- Chueca, B., Berdejo, D., Gomes-Neto, N. J., Pagán, R., & García-Gonzalo, D. (2016). Emergence of hyper-resistant *Escherichia coli* MG1655 derivative strains after applying sub-inhibitory doses of individual constituents of essential oils. *Frontiers in Microbiology*, 7, 273.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. CLSI M26-A. Wayne, PA. (1999).
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. Approved Standard M31-A3, Third Edition. Wayne, PA. (2008).
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. Approved Standard VET01.A4, Fourth Edition. Wayne, PA. (2013).
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. CLSI supplement VET01S, Third Edition. Wayne, PA. (2015).
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests. CLSI M100-S27. Wayne, PA. (2017).
- Cloutier, G., D’Allaire, S., Martinez, G., Surprenant, C., Lacouture, S., & Gottschalk, M. (2003). Epidemiology of *Streptococcus suis* serotype 5 infection in a pig herd with and without clinical disease. *Veterinary microbiology*, 97(1-2), 135–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14637045>

- Dahiya, S., Kapil, A., Lodha, R., Kumar, R., Das, B. K., Sood, S., & Kabra, S. K. (2014). Induction of resistant mutants of *Salmonella enterica* serotype Typhi under ciprofloxacin selective pressure. *The Indian Journal of Medical Research*, 139(5), 746
- de Jong, A., Thomas, V., Simjee, S., Moyaert, H., Garch, F., Maher, K., Morrissey, I., Butty, P., Klein, U., Marion, H., Rigaut, D., Valle, M., 2014. Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe: The VetPath study. *Vet Microbiol*, 172, 202-215.
- de Souza, K. K., Klein, C. S., Kich, J. D., Coldebella, A. & Alberton, G. C. (2008). Optimization of PCR technique for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Ciencia Rural* 38, 2239-2244.
- Dee, S.A., Carlson, A.R., Winkelman, N.L. and Corey, M.M. (1993) Effect of management-practices on the *Streptococcus suis* carrier rate in nursery swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 203, 295-299.
- Di Pasqua R, Betts G, Hoskins N, et al. (2007). Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J Agric Food Chem* 55:4863–70.
- Directiva 2008/120/CE del Consejo, de 18 de diciembre de 2008 , relativa a las normas mínimas para la protección de cerdos. *Diario Oficial de la Unión Europea*. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008L0120&from=es>
- Donlan, R.M., Costerton, J.W., (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 15,167–193
- Dorman, H.J.D. and Deans, S.G. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88, 308-316.
- Dörr T, Lewis K, Vulić M. 2009. SOS Response Induces Persistence to Fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *Plos. Genet.* 5: 1-9.
- Dorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., & Nedović, V. (2015). Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews*, 7(4), 452-490.
- Drlica, K. (2003). The mutant selection window and antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(1), 11-17.
- Dušan F, Marian, S., Katarina, D. and Dobroslava, B. (2006) Essential oils - their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicology in Vitro* 20, 1435-1445.
- El Garch, F., de Jong, A., Simjee, S., Moyaert, H., Klein, U., Ludwig, C., Marion, H., Haag-Diergarten, S., Richard-Mazet, A., Thomas, V. and Siegwart, E. (2016) Monitoring of antimicrobial susceptibility of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe, 2009-2012: VetPath results. *Veterinary Microbiology* 194, 11-22.

- Erickson, E.D., Doster, A.R. and Pokorny, T.S. (1984) Isolation of *Streptococcus suis* from swine in nebraska. Journal of the American Veterinary Medical Association 185, 666-668.
- Esgleas, M., Lacouture, S., & Gottschalk, M. (2005). *Streptococcus suis* serotype 2 binding to extracellular matrix proteins. FEMS microbiology letters, 244(1), 33–40. doi:10.1016/j.femsle.2005.01.017
- Elliott, S.D. and Tai, J.Y. (1978) Type-specific polysaccharides of *Streptococcus suis*. Journal of Experimental Medicine 148, 1699-1704.
- European Medicines Agency (EMA). Marzo de 1996. European Agency for the Evaluation of Medical Products - Thtmol. EMEA/MRL/075/96-FINAL
- European Commission (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of September 22, On additives in animal feed. L 268/29 (2003).
- European Commission (EC), Communication from the Commission to the European Parliament and the Council. Brussels, 15.11.2011. COM 748 final. Plan of action against the growing threat of bacterial resistance (2013).
- European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (EUCAST), Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the definitive document E. Def 1.2, 503–508, CMI, Vol. 6 (2000).
- European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (EUCAST), Gentamicin - Rationale for the EUCAST clinical breakpoints. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the definitive document, version 1.2. 16thFebruary. (2009).
- European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (EUCAST), Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.0, <http://www.eucast.org> (2017).
- Fabio, A., Cermelli, C., Fabio, G., Nicoletti, P. and Quaglio, P. (2007) Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on microorganisms responsible for respiratory infections. Phytotherapy Research 21, 374-377.
- Facklam, R.R. y Wilkinson, H.W. The family Streptococcocaeae (medical aspects). M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows, H.G. Schlegel (Eds.), The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria, Springer-Verlag, New York (1981), pp. 1572-1597.
- Fadli, M., Chevalier, J., Saad, A., Mezrioui, N. E., Hassani, L., & Pages, J. M. (2011). Essential oils from Moroccan plants as potential chemosensitisers restoring antibiotic activity in resistant Gram-negative bacteria. International Journal of Antimicrobial Agents, 38(4), 325-330.

- Feng, Y., Zhang, H., Ma, Y., & Gao, G. F. (2010). Uncovering newly emerging variants of *Streptococcus suis*, an important zoonotic agent. *Trends in microbiology*, 18(3), 124–31. doi:10.1016/j.tim.2009.12.003
- Fittipaldi, N., Sekizaki, T., Takamatsu, D., De la Cruz Domínguez-Punaro, M., Harel, J., Bui, N. K., Vollmer, W., et al. (2008). Significant contribution of the *pgdA* gene to the virulence of *Streptococcus suis*. *Molecular microbiology*, 70(5), 1120–35. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06463.x
- Fittipaldi, N., Fuller, T. E., Teel, J. F., Wilson, T. L., Wolfram, T. J., Lowery, D. E., & Gottschalk, M. (2009). Serotype distribution and production of muramidase-released protein, extracellular factor and suilysin by field strains of *Streptococcus suis* isolated in the United States. *Veterinary microbiology*, 139(3-4), 310–7. doi:10.1016/j.vetmic.2009.06.024.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Antimicrobial resistance in food and agriculture. *FAO Journal*. (April, 2001).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). The dynamics of sanitary and technical requirements assisting the poor to cope, Rome, 22 – 24 June 2004. <http://www.fao.org/docrep/009/a0011e/a0011e00.htm#TOC>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO): Los cerdos locales en los sistemas tradicionales <http://www.fao.org/3/a-y2292s.pdf>
- Food y Water Europe. ¿Un país para cerdos? Informe, marzo de 2017. <https://www.foodandwatereurope.org/reports/un-pais-para-cerdos/>
- Fratini, F., Mancini, S., Turchi, B., Friscia, E., Pistelli, L., Giusti, G. and Cerri, D. (2017) A novel interpretation of the Fractional Inhibitory Concentration Index: The case *Origanum vulgare* L. and *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst essential oils against *Staphylococcus aureus* strains. *Microbiological Research* 195, 11-17.
- Freires, I.A., Denny, C., Benso, B., de Alencar, S.M. and Rosalen, P.L. (2015) Antibacterial Activity of Essential Oils and Their Isolated Constituents against Cariogenic Bacteria: A Systematic Review. *Molecules* 20, 7329-7358.
- Galbarro, J., Franco-Alvarez, F., Cano, R., Castaño, M.A. 2009. Meningitis aguda y espondodiscitis por *Streptococcus suis* en paciente sin contacto previo con cerdos o productos porcinos derivados. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 27(7): 425–434
- Galvão L.C.D., Furletti, V.F., Bersan, S.M.F., da Cunha, M.G., Ruiz, A., de Carvalho, J.E., Sartoratto, A., Rehder, V.L.G., Figueira, G.M., Duarte, M.C.T., Ikegaki, M., de Alencar, S.M. and Rosalen, P.L. (2012) Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Streptococcus mutans* and their Antiproliferative Effects. *Evidence-Based*
- García, J.A., Cantón, R., Sánchez, J.E., Gómez-Lus, M.L., Martínez, L., Rodríguez Avial, C., & Vila, J. (2000). Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En: *Procedimientos en microbiología clínica*. Edita: Sociedad

- Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (España). Complementary and Alternative Medicine, 12.
- Garibaldi, M., Rodríguez-Ortega, M. J., Mandanici, F., Cardaci, A., Midiri, A., Papasergi, S., Gambadoro, O., et al. (2010). Immunoprotective activities of a *Streptococcus suis* pilus subunit in murine models of infection. *Vaccine*, 28(20), 3609–16. doi:10.1016/j.vaccine.2010.01.009
- Gill, A. O., Delaquis, P., Russo, P., & Holley, R. A. (2002). Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*, 73(1), 83-92.
- Gill AO, Holley RA. (2004). Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Appl Environ Microbiol* 70: 5750–5.
- Gill AO, Holley RA. (2006). Disruption of *E. coli*, *L. monocytogenes* and *L. sakei* cellular membranes by plant essential oils aromatics. *Int J Food Microbiol* 108:1–9.
- Gómez-Gascón L, Cardoso-Toset F, Amarilla PS, Tarradas C, Carrasco L, Olaya-Abril A, Jiménez-Munguía I, Rodríguez-Ortega MJ, Luque I. 2014. A new recombinant SsnA protein combined with aluminum hydroxide protects mouse against *Streptococcus suis*. *Vaccine*, 32(51):6992-6999. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.10.019. Epub 2014 Oct 28.
- Gómez-Gascón L, Cardoso-Toset F, Tarradas C, Gómez-Laguna J, Maldonado A, Nielsen J, Olaya-Abril A, Rodríguez-Ortega MJ, Luque I. 2016. Characterization of the immune response and evaluation of the protective capacity of rSsnA against *Streptococcus suis* infection in pigs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 47:52-9. doi: 10.1016/j.cimid.2016.06.001.
- Gómez-Gascón L, Luque I, Olaya-Abril A, Jiménez-Munguía I, Orbegoza-Medina RA, Peralbo E, Tarradas C, Rodríguez-Ortega MJ. 2012. Exploring the pan-surface of *Streptococcus suis*: looking for common protein antigens. *J Proteomics*, 22; 75(18):5654-66. doi: 10.1016/j.jprot.2012.07.025.
- Goñi P., Lopez, P., Sanchez, C., Gomez-Lus, R., Becerril, R. and Nerin, C. (2009) Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry* 116, 982-989.
- Gottschalk, M., & Segura, M. (2000). The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Veterinary microbiology*, 76(3), 259–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10973700>
- Gottschalk, M., J. Xu, C. Calzas, M. Segura. (2010). *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? *Future Microbiol*, 5 (3):371-391.
- Gottschalk, M. Streptococcosis; Capítulo 62. Diseases of swine. Edited by Jeffrey J. Zimmerman [et al.]. –ISBN 978-0-8138-2267-9. 10th ed. (2012).

- Gottschalk M, Lacouture S, Bonifait L, Roy D, Fittipaldi N, Grenier D. (2013) Characterization of *Streptococcus suis* isolates recovered between 2008 and 2011 from diseased pigs in Quebec, Canada. *Vet Microbiol*;162: 819–825.
- Goyette-Desjardins, G., Auger, J.-P., Xu, J., Segura, M., & Gottschalk, M. 2014. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerging Microbes & Infections*, 3(6), e45–. <http://doi.org/10.1038/emi.2014.45>
- Gradinaru, A.C., Miron, A., Trifan, A., Spac, A., Brebu, M., Aprotosoie, A.C., 2014. Screening of antibacterial effects of anise essential oil alone and in combination with conventional antibiotics against *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi* 118: 537-543.
- Grau, S., Marín, M., Álvarez, F., Company, D., Gimeno-Bayón, J., Saballs, P., Drobnic, L., Saballs, M. (2005). Antimicrobianos. *Farmacia Hospitalaria*, 29(5), 147-208.
- Grenier, D., Grignon, L. and Gottschalk, M. (2009) Characterisation of biofilm formation by a *Streptococcus suis* meningitis isolate. *Veterinary Journal* 179, 292-295.
- Griffin, S. G., Markham, J. L., & Leach, D. N. (2000). An agar dilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 12(2), 249-255.
- Gutiérrez, J. (2006). Estudio de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales frente a diferentes serotipos de *Salmonella* spp. Tesina de Licenciatura de Veterinaria, Universidad de Córdoba - España.
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV. (2012). Effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil and the major monoterpene component terpinen-4-ol on the development of single- and multistep antibiotic resistance and antimicrobial susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 56:909–15.
- Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A.K., Doble, M., 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine* 15: 639-652.
- Hernandez, T., Canales, M., Avila, J.G., Garcia, A.M., Martinez, A., Caballero, J., de Vivar, A.R. and Lira, R. (2005) Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 96, 551-554.
- Higgins, R. y Gottschalk, M. (1990) An update on *Streptococcus suis* identification. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 2, 249-252.
- Higgins, R. and M. Gottschalk, 2006: Streptococcal diseases, p. 796-883. In B.E., Straw, J.J., Zimmerman, S., D'Allaire, D.J. Taylor, (ed), *Diseases of swine*. 9th ed. Blackwell Publishing, USA,

- Hill, J.E.; Gottschalk, M.; Brousseau, R.; Harel, J.; Hemmingsen, S.M.; Goh, S.H.(2005). Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate the *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. Vet. Microbiol. 107, 63–69.
- Hossain, S. Z., Bojko, B., & Pawliszyn, J. (2013). Automated SPME–GC–MS monitoring of headspace metabolomic responses of *E. coli* to biologically active components extracted by the coating. Analytica Chimica Acta, 776, 41-49.
- Huerta, B., Gutiérrez, J., Astorga, R., Borge, C., Carbonero, A., García, I. y Perea, A. (2004). Actividad in vitro de 27 aceites esenciales frente a cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipos Enteritidis y Typhimurium. IX Simposio Anual Avedila. Córdoba - España.
- Huerta, B., Ponsa, F., Ordóñez, G., Fernández, N., Peñalver, P. (2005). Estudio de eficacia de aceites esenciales ante una infección experimental de *Salmonella* Enteritidis en gallinas ponedoras en producción. XLII Simposium Científico de Avicultura. Cáceres - España.
- Huerta, B., Barrero-Dominguez, B., Galan-Relano, A., Tarradas, C., Maldonado, A. and Luque, I. (2016) Essential Oils in the Control of Infections by *Staphylococcus xylosus* in Horses. Journal of Equine Veterinary Science 38, 19-23.
- Idoate, A., & Idoipe, A. (2002). Investigación y ensayos clínicos. Farmacia hospitalaria, 1, 325-344.
- Inouye, S., Takizawa, T. and Yamaguchi, H. (2001) Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 47, 565-573.
- Inouye, S., Uchida, K., Maruyama, N., Yamaguchi, H. and Abe, S. (2006) A novel method to estimate the contribution of the vapour activity of essential oils in agar diffusion assay. Jpn J Med Mycol 47, 91–98.
- Isabel, B., & Santos, Y. (2009). Efectos de los aceites esenciales en la alimentación de los pollos de carne. Archivos de Zootecnia, 58(1).
- Jakhetia, V., Patel, R., Khatri, P., Pahuja, N., Garg, S., Pandey, A., & Sharma, S. (2010). Cinnamon: a pharmacological review. Journal of Advanced Scientific Research, 1(2), 19-23.
- King, S. J., Leigh, J. A., Heath, P. J., Luque, I., Tarradas, C., Dowson, C. G., & Whatmore, A. M. (2002). Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange. Journal of clinical microbiology, 40(10), 3671–80.
- Knezevic P, et al. Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. Journal of Ethnopharmacology 2016;178:125-136.

- Kollanoor-Johny, A. K., Hoagland, T., Venkitanarayanan, K. (2010). Effect of subinhibitory concentrations of plant-derived molecules in increasing the sensitivity of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 to antibiotics. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7, 1165–70.
- Kon, K. V., & Rai, M. K. (2012). Plant essential oils and their constituents in coping with multidrug-resistant bacteria. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 10(7), 775-790.
- Lahlou, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, 18, 435-448.
- Laird, K. and Phillips, C. (2012) Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials? *Letters in Applied Microbiology* 54, 169-174.
- Lan, R.X., Li, T.S. and Kim, I.H. (2016) Effects of essential oils supplementation in different nutrient densities on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics and fecal microbial shedding in weaning pigs. *Animal Feed Science and Technology* 214, 77-85.
- Langeveld, W.T., Veldhuizen, E.J.A. and Burt, S.A. (2014) Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical Reviews in Microbiology* 40, 76-94.
- Lewis K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 48-56.
- Li, Y., Gottschalk, M., Esgleas, M., Lacouture, S., Dubreuil, J. D., Willson, P., & Harel, J. 2007. Immunization with Recombinant Sao Protein Confers Protection against *Streptococcus suis* Infection *Clin Vaccine Immunol*, 14(8): 937–943.
- Liu Z, Zheng H, Gottschalk M *et al.* (2013). Development of multiplex PCR assays for the identification of the 33 serotypes of *Streptococcus suis*. *PLoS One*;8: e72070.
- Llana-Ruiz-Cabello, M., Gutierrez-Praena, D., Puerto, M., Pichardo, S., Jos, A. and Camean, A.M. (2015) In vitro pro-oxidant/antioxidant role of carvacrol, thymol and their mixture in the intestinal Caco-2 cell line. *Toxicology in Vitro* 29, 647-656.
- López, P., Sanchez, C., Batlle, R. and Nerin, C. (2005) Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 6939-6946.
- Lun, Z.-R., Wang, Q.-P., Chen, X.-G., Li, A.-X. and Zhu, X.-Q. (2007) *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *Lancet Infectious Diseases* 7, 201-209.
- Luque, I., V. Blume, C. Borge, A.I Vela, J.A. Perea, J.M. Márquez, J.F. Fernández-Garayzábal, C.Tarradas. (2010) Genetic analysis of *Streptococcus suis* isolates recovered from diseased and healthy carrier pigs at different production stages on a pig farm. *Vet J* 186(3) 396-8.

- Luque, I; C Tarradas; R. Astorga; A. Perea. 1998. The presence of muramidase released protein and extracellular factor protein in various serotypes of *Streptococcus suis* isolated from diseased and healthy pigs in Spain. *Res Vet Sci*, 66, 69-72.
- Luz, I. D. S., de Melo, A. N. F., Bezerra, T. K. A., Madruga, M. S., Magnani, M., & de Souza, E. L. (2014). Sublethal amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol cause injury and changes in membrane fatty acid of *Salmonella* Typhimurium cultivated in a meat broth. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(5), 357-361.
- Lv, F., Liang, H., Yuan, Q. and Li, C. (2011) *In vitro* antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International* 44, 3057-3064.
- MacGowan, A. P., & Wise, R. (2001). Establishing MIC breakpoints and the interpretation of *in vitro* susceptibility tests. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl 1), 17-28.
- Madec, F. (1985) Water-intake of pregnant sows in intensive rearing conditions - relationships with some urine characteristics. *Annales De Zootechnie* 34, 373-373.
- Madsen, L. W., Bak, H., Nielsen, B., Jensen, H.E., Aalbaek, B., & Riising, H. J. (2002). Bacterial colonization and invasion in pigs experimentally exposed to *Streptococcus suis* serotype 2 in aerosol. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 49(5), 211–5.
- Magi, G., Marini, E. and Facinelli, B. (2015) Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A Streptococci. *Frontiers in Microbiology* 6.
- Mandanici F, Gómez-Gascón L, Garibaldi M, Olaya-Abril A, Luque I, Tarradas C, Mancuso G, Papasergi S, Bárcena JA, Teti G, Beninati C, Rodríguez-Ortega MJ. 2010. A surface protein of *Streptococcus suis* serotype 2 identified by proteomics protects mice against infection. *J Proteomics* Nov 10;73 (12):2365-9. Epub 2010 Jul 23.
- Mann, C.M. and Markham, J.L. (1998) A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology* 84, 538-544.
- Manzanilla, E.G., Perez, J.F., Martin, M., Kamel, C., Baucells, F. and Gasa, J. (2004) Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *Journal of Animal Science* 82, 3210-3218.
- Marois C, Bougeard S, Gottschalk M, Kobisch M. Multiplex PCR assay for detection of *Streptococcus suis* species and serotypes 2 and 1/2 in tonsils of live and dead pigs. *J Clin Microbiol* 2004;42: 3169–3175.
- Martinez, J.L. and Baquero, F. (2000) Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 1771-1777.

- Martínez, R. M., Cerrilla, M. E. O., Haro, J. G. H., Garza, J. R. K., Ramos, J. J. Z., & Robles, R. S. (2015). Uso de aceites esenciales en animales de granja. *Interciencia*, 40(11), 744.
- Maruzzella, J.C. and Sicurella, N.A. (1960) Antibacterial activity of essential OIL VAPORS. *Journal of the American Pharmaceutical Association* 49, 692-694.
- Mayaud, L., Carricajo, A., Zhiri, A. and Aubert, G. (2008) Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Letters in Applied Microbiology* 47, 167-173.
- Michiels, J., Missotten, J., Dierick, N., Fremaut, D., Maene, P. and De Smet, S. (2008) In vitro degradation and in vivo passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88, 2371-2381.
- Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA). El sector de la carne de cerdo en cifras principales indicadores económicos en 2016 mayo 2017. Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado: <http://publicacionesoficiales.boe.es/>.
- Mith, H., Dure, R., Delcenserie, V., Zhiri, A., Daube, G., & Clinquart, A. (2014). Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Science & Nutrition*, 2(4), 403-416.
- Monte, D. F., Tavares, A. G., Albuquerque, A. R., Sampaio, F. C., Oliveira, T. C., Franco, O. L., ... & Magnani, M. (2014). Tolerance response of multidrug-resistant *Salmonella enterica* strains to habituation to *Origanum vulgare* L. essential oil. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1-5.
- Montes, M. and García-Arenzana, J.M. (2007) Género *Streptococcus*: una revisión práctica para el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24 Supl 3:14-20
- Moon, S.E., Kim, H.Y. and Cha, J.D. (2011) Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. *Archives of Oral Biology* 56, 907-916.
- Montravers, P., & Dupont, H. (1996). Monitoring d'une antibiothérapie. *Conférences D'actualisation*, 651-668.
- Muñoz, C. y Porrero, C. Curso de Plan de Formación Continuada para Profesionales de la Sanidad Animal. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). 11 y 12 enero (2017)
- Namkung, H., Li, M., Gong, J., Yu, H., Cottrill, M. and de Lange, C.F.M. (2004) Impact of feeding blends of organic acids and herbal extracts on growth performance, gut microbiota and digestive function in newly weaned pigs. *Canadian Journal of Animal Science* 84, 697-704

- Nantitanon, W., Chow, S., Okonogi, C. (2007) Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Hyptis suaveolens* Essential oil. *Sci Pharmaceutical*. 7, 35-46.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R. and De Feo, V. (2013) Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* 6, 1451-1474.
- Neill, C.R., Nelssen, J.L., Tokach, M.D., Goodband, R.D., DeRouchey, J.M., Dritz, S.S., Groesbeck, C.N. and Brown, K.R. (2006) Effects of oregano oil on growth performance of nursery pigs. *Journal of Swine Health and Production* 14, 312-316.
- Nordqvist, H., Nilsson, L. E., & Claesson, C. (2016). Mutant prevention concentration of colistin alone and in combination with rifampicin for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35(11), 1845-1850.
- O'Bryan, C. A., Pendleton, S. J., Crandall, P. G., & Ricke, S. C. (2015). Potential of plant essential oils and their components in animal agriculture *in vitro* studies on antibacterial mode of action. *Frontiers in Veterinary Science*, 2, 1-8
- Odds, F.C. (2003) Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52, 1-1.
- Okura, M., Osaki, M., Nomoto, R., Arai, S., Osawa, R., Sekizaki, T. and Takamatsu, D. (2016) Current Taxonomical Situation of *Streptococcus suis*. *Pathogens* 5.
- Okwumabua O, O'Connor M, Shull E. (2003). A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase. *FEMS Microbiol Lett*;218: 79–84
- Oladimeji F, Orafidiya O, Okeke I, Dagne E (2001). Effect of autoxidation on the composition and antimicrobial activity of essential oil of *Lippia multiflora*. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, 2(11): 64-67.
- Organización para la cooperación económica y el Desarrollo (OCED) guía 407 (2008). Guía para pruebas de toxicidad aguda oral con químicos. OECD guidelines for the testing of chemicals, Test Guideline 407.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/> (2017).
- Palaniappan, K., Holley, R.A., (2010). Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *Int J Food Microbiol* 140, 164-168.
- Palmieri, C., Varaldo, P.E., Facinelli, B., (2011). *Streptococcus suis*, an emerging drug-resistant animal and human pathogen. *Front Microbiol* 2, 6.

- Pan, Z.; Ma, J.; Dong, W.; Song, W.; Wang, K.; Lu, C.; Yao, H. (2015). Novel variant serotype of *Streptococcus suis* isolated from piglets with meningitis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81, 976–985.
- Papadopoulos, C. J., Carson, C. F., Chang, B. J., & Riley, T. V. (2008). Role of the MexAB-OprM efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* in tolerance to tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its monoterpene components terpinen-4-ol, 1, cineole, and α -terpineol. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(6), 1932–1935.
- Pavela, R., (2015). Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: a review. *Industrial Crops and Products* 76, 174–187.
- Peinado-Guevara, H., Green-Ruíz, C., Herrera-Barrientos, J., Escolero-Fuentes, O., Delgado-Rodríguez, O., Belmonte-Jiménez, S., & Ladrón de Guevara, M. (2012). Relationship between chloride concentration and electrical conductivity in groundwater and its estimation from vertical electrical soundings (VESs) in Guasave, Sinaloa, Mexico. *Ciencia e Investigación Agraria*, 39(1), 229–239.
- Peñalver, P., Huerta, B., Borge, C., Astorga, R., Romero, R., & Perea, A. (2005). Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 113, 1–6.
- Persson K, et al. Asymptomatic bacteriuria during pregnancy with special reference to group-b streptococci. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* (1985);17:195–199.
- Pfaller, M.A., Sheehan, D.J. and Rex, J.H. (2004) Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: Lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clinical Microbiology Reviews* 17, 268–+.
- Pichersky, E., Noel, J. P., & Dudareva, N. (2006). Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*, 311(5762), 808–811.
- Portis, E., Lindeman, C., Johansen, L. and Stoltman, G. (2013) Antimicrobial susceptibility of porcine *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, and *Actinobacillus pleuropneumoniae* from the United States and Canada, 2001 to 2010. *Journal of Swine Health and Production* 21, 30–41.
- Principalli, M.S., Palmieri, C., Magi, G., Vignaroli, C., Manzin, A., Camporese, A., Barocci, S., Magistrali, C. and Facinelli, B. (2009) Genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs and humans in Italy (2003–2007). *Eurosurveillance* 14, 15–21.
- Pu Y, Zhao Z, Li Y, Zou J, Ma Q, Zhao Y, Ke Y, Zhu Y, Chen H, Baker MA, Ge H, Sun Y, Xie XS, Bai F. (2016). Enhanced Efflux Activity Facilitates Drug Tolerance in Dormant Bacterial Cells. *Mol. Cell*. 62: 284–294.

- Radhakrishnan N and Gnanamani A, M.A. (2011) A potential antibacterial agent Embelin, a natural benzoquinone extracted from *Embelia ribes*. pp.1-7. *Embelia ribes*. Biol Med (Aligarh).
- Ragland, D., Schneider, J., Stevenson, D., Hill, M.A. and Bakker, M. (2007) Oregano oil as an alternative to antimicrobials in nursery diets. *Journal of Swine Health and Production* 15, 346-351.
- Robertson I.D., Blackmore D.K. Occupational exposure to *Streptococcus suis* type 2. *Epidemiol Infect* 1989;103: 157–164.
- Rojas, M.M., Sánchez, Y., Abreu, Y., Espinosa, I., Correa, T.M. and Pino, O. (2012) Chemical characterization and antibacterial activity of essential oils of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum basilicum* var. genovese L. *Revista de Protección Vegetal* 2012;27:130-134.
- Ross, Z.M., O'Gara, E.A., Hill, D.J., Sleightholme, H.V. and Maslin, D.J. (2001) Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: Evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 475-480.
- Rota, C., Carraminana, J.J., Burillo, J. and Herrera, A. (2004) *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection* 67, 1252-1256.
- Said, L.A., Zahlane, K., Ghalbane, I., El Messoussi, S., Romane, A., Cavaleiro, C. and Salgueiro, L. (2015) Chemical composition and antibacterial activity of *Lavandula coronopifolia* essential oil against antibiotic-resistant bacteria. *Natural Product Research* 29, 582-585.
- Sala V, Colombo A, Gerola L. (1989) Infection Risks of *Streptococcus suis* Type 2 Localizations in Slaughtered Swines. *Arch Vet It*;40: 180–184. Italian.
- Suntres, Z.E., Coccimiglio, J., Alipour, M., (2015). The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Critical reviews in food science and nutrition* 55, 304–318.
- Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., van Duijkeren, E., Johnson, A.P. and Gaastra, W. (2010) Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Veterinary Microbiology* 141, 1-4.
- Sfeir, J., Lefrancois, C., Baudoux, D., Derbre, S. and Licznar, P. (2013) *In Vitro* Antibacterial Activity of Essential Oils against *Streptococcus pyogenes*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Shaaban, H.A.E., El-Ghorab, A.H. and Shibamoto, T. (2012) Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. *Journal of Essential Oil Research* 24, 203-212.

- Sharma G, et al. Inhibitory effect of cinnamaldehyde alone and in combination with thymol, eugenol and thymoquinone against *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Herbal Medicine* 2017;9:68-73.
- Sienkiewicz, M., Kowalczyk, E., & Wasiela, M. (2012). Recent patents regarding essential oils and the significance of their constituents in human health and treatment. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 7(2), 133-140.
- Silva, N., Alves, S., Gonçalves, A., Amaral, J. S., & Poeta, P. (2013). Antimicrobial activity of essential oils from mediterranean aromatic plants against several foodborne and spoilage bacteria. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 19(6), 503-510.
- Silveira, E. A., González García, O., & Medina Marrero, R. (2005). Actividad *in vitro* 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano frente a *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 6(10).
- Simitzis, P.E., Symeon, G.K., Charismiadou, M.A., Bizelis, J.A. and Deligeorgis, S.G. (2010) The effects of dietary oregano oil supplementation on pig meat characteristics. *Meat Science* 84, 670-676.
- Solarte, A.L., Astorga, R.J., Aguiar, F., Galan-Relano, A., Maldonado, A. and Huerta, B. (2017) Combination of Antimicrobials and Essential Oils as an Alternative for the Control of *Salmonella enterica* Multiresistant Strains Related to Foodborne Disease. *Foodborne Pathogens and Disease* 14, 558-563.
- Solarte, A.L., Astorga, R.J., de Aguiar, F.C., De Frutos, C., Barrero-Dominguez, B. and Huerta, B. Susceptibility Distribution to Essential Oils of *Salmonella enterica* Strains Involved in Animal and Public Health and Comparison of the Typhimurium and Enteritidis Serotypes. *Journal of Medicinal Food*, 5.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food control*, 21(9), 1199-1218.
- Tang, J., Wang, C., Feng, Y., Yang, W., Song, H., Chen, Z., Yu, H., Pan, X., Zhou, X., Wang, H., Wu, B., Wang, H., Zhao, H., Lin, Y., Yue, J., Wu, Z., He, X., Gao, F., Khan, A.H., Wang, J., Zhao, G.P., Wang, Y., Wang, X., Chen, Z., Gao, G.F., 2006. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *Plos Med* 3, 668-676.
- Tarradas, C.; A. Arenas; A. Maldonado; I. Luque; A. Miranda and A. Perea. (1994). Identification of *Streptococcus suis* isolated from swine: proposal for biochemical parameters. *J Clin Microbiol*, 32 (2): 578-580.
- Tarradas, C., I. Luque, D. de Andres, Y.E. Abdel-Aziz Shahein, P. Pons and F. Gonzalez et al. 2001. Epidemiological relationship of human and swine *Streptococcus suis* isolates, *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 48, 347–355.

- Tarradas, C., Borge, C., Arenas, A., Maldonado, A., Astorga, R., Miranda, A., Luque, I. 2002. Suilysin production by *Streptococcus suis* strains isolated from diseased and healthy carrier pigs in Spain. *Vet Rec*, 148:183–184.
- Tarradas, C., Perea, A., Vela, A.I., Goyache, J., Dominguez, L., Fernandez-Garaizabal, J.F., Borge, C., Huerta, B. and Luque, I. (2004) Distribution of serotypes of *Streptococcus suis* isolated from diseased pigs in Spain. *Veterinary Record* 154, 665–666.
- Tien le, H.T.; Nishibori, T.; Nishitani, Y.; Nomoto, R.; Osawa, R. (2013). Reappraisal of the taxonomy of *Streptococcus suis* serotypes 20, 22, 26, and 33 based on DNA-DNA homology and sodA and recN phylogenies. *Vet. Microbiol.* 162, 842–849.
- Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, et al. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother* 49:2474–8.
- Ultee, A.; Bennik, M.H.; Moezelaar, R. (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1561–1568.
- Vaissaire, J., Marcon, C., Kobisch, M., Lemenec, M., Carnero, R., Laroche, M. and Mirial, G. (1985) Importance of Streptococcal disease (*Streptococcus suis*, group-r) in France. *Annales De Zootechnie* 34, 372–373.
- Van-Vuuren, S., & Viljoen, A. (2011). Plant-based antimicrobial studies—methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta Medica*, 77(11), 1168–1182.
- Varela, N.P., Gadbois, P., Thibault, C., Gottschalk, M., Dick, P. and Wilson, J. (2013) Antimicrobial resistance and prudent drug use for *Streptococcus suis*. *Animal Health Research Reviews* 14, 68–77.
- Vázquez-Aguilar, M. M. (2007). Fundamentos de la determinación de parámetros Referencias bibliográficas 186 cinéticos para microorganismos de interés en tratamiento térmico de alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 1, 1 14.
- Vela, A.I., J. Goyache, C. Tarradas, I. Luque, A. Mateos, M.A. Moreno, C. Borge, J.A. Perea, L. Domínguez and J.F. Fernández-Garayzábal, (2003): Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2498–2502.
- Vela, A.I., Morena, M.A., Cebolla, J.A., Gonzalez, S., Latre, M.V., Dominguez, L., Fernandez-Garayzabal, J.F., (2005). Antimicrobial susceptibility of clinical strains of *Streptococcus suis* isolated from pigs in Spain. *Veterinary Microbiology* 105, 143–147.
- Vinks, A., Derendorf, H., Mouton, J., (2014) Fundamentals of Antimicrobial Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. Springer New York Heidelberg Dordrecht London. DOI 10.1007/978-0-387-75613-4

- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey, F.A. Karl-Heinz Schleifer, K.H. Whitman, W.B. 2011. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Springer Science & Business Media, 28 ene. 2011 - 1450 pp.
- Xu, J.; Zhou, F.; Ji, B.P.; Pei, R.S.; Xu, N. (2008) The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 174–179.
- Wei Z, Li R, Zhang A et al. (2009); Characterization of *Streptococcus suis* isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007. *Vet Microbiol* 137: 196–201
- Wertheim, H.F.L., Nghia, H.D.T., Taylor, W. and Schultsz, C. (2009) *Streptococcus suis*: An Emerging Human Pathogen. *Clinical Infectious Diseases* 48, 617–625.
- Wang K, Sun X, Lu C. (2012). Development of rapid serotype-specific PCR assays for eight serotypes of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol*;50: 3329–3334.
- Wisselink HJ, Joosten JJ, Smith HE (2002). Multiplex PCR assays for simultaneous detection of six major serotypes and two virulence-associated phenotypes of *Streptococcus suis* in tonsillar specimens from pigs. *J Clin Microbiol* 40: 2922–2929
- Wisselink, H.J., Veldman, K.T., Van den Eede, C., Salmon, S.A. and Mevius, D.J. (2006) Quantitative susceptibility of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries to antimicrobial agents licenced in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology* 113, 73–82.
- World Health Organization Outbreak associated with *Streptococcus suis* in pigs in China. 2005. http://www.who.int/csr/don/2005_08_03/en/
- Yan, L., Wang, J. P., Kim, H. J., Meng, Q. W., Ao, X., Hong, S. M., & Kim, I. H. (2010). Influence of essential oil supplementation and diets with different nutrient densities on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, meat quality and fecal noxious gas content in grower–finisher pigs. *Livestock Science*, 128(1), 115–122.
- Yap, P.S.X., Yiap, B.C., Ping, H.C. and Lim, S.H.E. (2014) Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The open microbiology journal* 8, 6–14.
- Yu H, Jing H, Chen Z et al. (2006) Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China. *Emerg Infect Dis*;12: 914–920.
- Zeng, Z.K., Zhang, S., Wang, H.L. and Piao, X.S. (2015) Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 6, 10.

Capítulo 13

Anexos

Anexo 1. Capítulo 4 - Material y Métodos generales.Resultados de CMI de los antibióticos convencionales frente a las 60 cepas de *S. suis*.

Referencia		Concentración Mínima Inhibitoria (µg/ml)					Trimethoprin / sulfametoxazol
		Penicilina	Enrofloxacin	Ceftiofur	Gentamicina	Oxitetraciclina	
1	638/03	0,06	1	0,5	16	512	4
2	P1/7	0,06	0,5	0,5	32	1	2
3	235/02	0,06	1	0,25	16	64	4
4	365/03	0,06	1	0,25	16	256	8
5	682/06	0,03	0,5	0,25	16	64	2
6	123/11	1	0,5	4	16	256	16
7	93/05	0,03	0,5	0,125	8	32	8
8	203/05	0,03	0,5	0,125	8	32	2
9	225/00	0,5	1	0,25	16	2	4
10	14/03	0,03	0,5	0,25	16	64	2
11	636/03	0,03	0,5	0,5	16	64	8
12	196/05	0,125	0,5	1	8	64	8
13	792/02	0,03	0,5	0,06	16	64	2
14	633/99	0,5	32	0,5	512	128	64
15	5215	0,5	16	0,5	512	128	32
16	316/12	0,03	0,5	0,125	8	16	2
17	22/02	0,5	1	2	1	1	1
18	204/03	0,125	0,5	1	16	128	512
19	26/03	0,06	0,25	0,5	2	32	512
20	40/03	0,03	0,5	0,25	32	128	0,25
21	160/03	0,03	0,25	0,25	32	128	0,25
22	553/05	0,03	0,25	0,25	16	128	0,5
23	3144	1	0,5	2	16	128	16
24	8010*	0,03	0,5	1	16	64	16
25	233/01	0,06	0,5	1	16	64	128
26	10/06	0,06	2	1	8	32	32
27	228/06	1	1	32	128	512	1
28	34/11	0,5	0,5	2	16	64	256
29	746/02	0,016	0,5	0,25	8	32	4
30	340/05	0,25	1	16	1	0,5	2
31	546/05	0,03	1	0,25	16	128	2
32	232/06	0,016	0,5	0,25	16	256	2
33	5225	0,03	0,5	0,125	16	2	32
34	609/02	1	0,5	2	8	64	8
35	668/02	0,03	0,5	0,125	16	256	8
36	724/02	0,016	0,5	0,125	8	64	2
37	226/03	2	0,5	0,5	16	64	256
35	592/06	0,016	0,5	0,125	8	64	0,5
39	261/12	0,03	0,5	0,06	8	256	32
40	20/17	4	1	2	8	64	256

Continuación Anexo 1.

41	36/12	0,016	0,5	0,06	8	64	2
42	574/02	0,5	1	2	2	512	1
43	273/12	2	0,5	0,5	1	1	8
44	341/12	0,03	0,5	0,25	4	0,5	0,25
45	6217	8	0,5	4	4	128	16
46	338/12	0,125	1	0,5	1	256	256
47	6218	0,125	0,25	0,25	8	32	0,25
48	10/17	0,03	2	0,25	4	1	1
49	269/12	0,016	0,5	0,125	2	16	4
50	6221	1	0,5	0,5	8	128	512
51	35/12	0,016	1	0,06	8	1	1
52	635/03	0,5	1	1	1	2	8
53	658/02	0,25	0,5	0,125	16	128	4
54	699/02	0,125	0,5	0,125	16	128	8
55	857/06	0,03	1	0,25	4	0,25	2
56	1299/06	0,03	1	0,25	4	128	2
57	34/11 H	0,03	1	0,5	4	0,25	256
58	1086/11	0,03	1	0,125	8	64	1
59	117/12	0,03	1	0,125	16	0,5	2
60	41/14	0,03	1	0,5	4	64	4

Anexo 2. Capítulo 5 - Primer Objetivo

2.1. Zona media de inhibición (\pm desviación estándar en mm) de la prueba de difusión por contacto directo de AE frente a 20 aislados de *S. suis*.

Cepa	Grupo I*		Grupo II	Grupo III			Grupo IV	Grupo V
	Tomillo rojo	Tomillo vulgar	Orégano	Canela	Menta	Clavo	Romero	Albahaca
P1/7	39,0 \pm 1,0	38,0 \pm 2,7	30,7 \pm 3,8	20,0 \pm 1,0	20,3 \pm 1,2	18,3 \pm 0,6	10,7 \pm 0,6	7,0 \pm 0,0
638/03	25,7 \pm 0,6	24,0 \pm 2,0	22,0 \pm 1,0	14,3 \pm 0,6	11,7 \pm 0,6	14,0 \pm 0,0	9,7 \pm 0,6	8,0 \pm 0,0
235/02	35,7 \pm 2,1	33,7 \pm 2,1	33,0 \pm 2,0	20,0 \pm 1,0	16,0 \pm 1,0	18,7 \pm 0,6	11,7 \pm 0,6	8,0 \pm 0,0
682/06	40,7 \pm 3,8	37,3 \pm 2,3	33,7 \pm 3,2	20,7 \pm 1,2	14,3 \pm 0,6	20,3 \pm 0,6	10,7 \pm 0,6	7,0 \pm 0,0
123/11	29,7 \pm 0,6	30,7 \pm 1,2	28,7 \pm 0,6	18,7 \pm 0,6	9,0 \pm 1,0	17,7 \pm 0,6	6,3 \pm 0,6	6,0 \pm 0,0
225/00	26,3 \pm 0,6	25,3 \pm 0,6	29,0 \pm 1,0	14,0 \pm 1,0	13,0 \pm 1,0	14,0 \pm 1,0	10,0 \pm 0,0	8,0 \pm 0,0
14/03	27,3 \pm 0,6	29,7 \pm 0,6	23,3 \pm 0,6	14,7 \pm 1,2	12,7 \pm 0,6	15,0 \pm 1,0	8,7 \pm 0,6	8,0 \pm 0,0
636/03	31,3 \pm 0,6	30,7 \pm 0,6	26,3 \pm 0,6	16,3 \pm 0,6	15,3 \pm 0,6	15,3 \pm 0,6	8,7 \pm 0,6	9,0 \pm 0,0
196/05	43,3 \pm 3,8	42,0 \pm 3,6	40,3 \pm 2,5	20,0 \pm 1,7	26,3 \pm 5,5	20,0 \pm 1,0	14,3 \pm 0,6	8,7 \pm 0,6
40/03	29,3 \pm 0,6	28,0 \pm 1,0	27,0 \pm 1,0	6,0 \pm 0,0	22,7 \pm 0,6	6,0 \pm 0,0	11,7 \pm 0,6	6,0 \pm 0,0
160/03	32,3 \pm 2,3	30,7 \pm 0,6	25,7 \pm 0,6	19,7 \pm 1,5	12,0 \pm 0,0	13,0 \pm 2,0	10,0 \pm 0,0	6,3 \pm 0,6
553/05	30,3 \pm 0,6	28,3 \pm 0,6	25,3 \pm 0,9	12,7 \pm 0,6	16,7 \pm 0,6	13,3 \pm 0,6	7,7 \pm 0,6	6,0 \pm 0,0
10/06	24,3 \pm 1,5	26,0 \pm 0,0	22,7 \pm 0,6	13,7 \pm 0,6	12,3 \pm 0,6	14,7 \pm 0,6	10,7 \pm 0,6	7,0 \pm 0,0
233/01	45,3 \pm 0,6	43,7 \pm 0,6	36,3 \pm 0,6	22,0 \pm 0,0	24,0 \pm 1,7	21,0 \pm 1,7	12,3 \pm 0,6	6,7 \pm 0,6
8010	49,3 \pm 5,9	43,3 \pm 1,5	40,3 \pm 3,2	27,0 \pm 3,6	12,7 \pm 0,6	28,0 \pm 2,0	12,3 \pm 0,6	8,0 \pm 0,0
6217	34,3 \pm 0,6	35,7 \pm 0,6	29,7 \pm 0,6	13,7 \pm 0,6	11,0 \pm 0,0	13,0 \pm 0,0	8,0 \pm 0,0	6,0 \pm 0,0
6218	49,3 \pm 1,2	49,0 \pm 3,5	36,0 \pm 1,0	18,0 \pm 1,0	36,3 \pm 2,1	17,0 \pm 1,0	15,7 \pm 0,6	6,0 \pm 0,0
6221	39,0 \pm 1,0	38,0 \pm 2,7	30,7 \pm 3,8	20,0 \pm 1,0	20,3 \pm 1,2	18,3 \pm 0,6	10,7 \pm 0,6	7,0 \pm 0,0
658/02	26,3 \pm 0,6	25,0 \pm 1,0	25,0 \pm 1,0	6,0 \pm 0,0	9,0 \pm 0,0	6,0 \pm 0,0	7,3 \pm 0,6	6,7 \pm 0,6
699/02	25,0 \pm 0,0	25,7 \pm 0,6	22,7 \pm 0,6	12,0 \pm 0,0	12,3 \pm 0,6	12,7 \pm 0,6	8,00 \pm 0,0	6,0 \pm 0,0
$\bar{x} \pm SD$	34,2 \pm 8,2	33,2 \pm 7,3	29,4 \pm 5,8	16,5 \pm 5,2	16,4 \pm 6,8	15,8 \pm 5,0	10,3 \pm 2,4	7,1 \pm 1,0
Rango	24,3 – 49,3	24,0 – 49,0	22,0 – 40,3	6,0 – 27,0	9,0 – 36,3	6,0 – 28,0	6,3 – 15,7	6,0 – 9,0

*Grupos de homogeneidad $P < 0,05$

2.2. Zona media de inhibición (\pm desviación estándar en mm) de la prueba de difusión por vapor de los AEs frente a 20 aislados de *S. suis*.

Cepa	Tomillo rojo	Tomillo vulgar	Orégano	Canela	Menta	Clavo	Romero	Albahaca
P1/7	21,5 \pm 0,7	24,5 \pm 0,7	22,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
638/03	24,5 \pm 0,7	23,0 \pm 0,0	21,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	9,5 \pm 0,7	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
235/02	22,0 \pm 0,0	20,5 \pm 0,7	19,0 \pm 1,4	0,0 \pm 0,0	19,0 \pm 1,4	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
682/06	28,5 \pm 0,7	24,5 \pm 0,7	22,5 \pm 0,7	0,0 \pm 0,0	6,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
123/11	23,0 \pm 0,0	24,0 \pm 1,4	20,5 \pm 0,7	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
225/00	23,5 \pm 0,7	25,0 \pm 0,0	20,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
14/03	24,5 \pm 0,7	25,0 \pm 0,0	20,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
636/03	29,0 \pm 1,4	28,5 \pm 0,7	23,5 \pm 0,7	0,0 \pm 0,0	6,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
196/05	26,5 \pm 0,7	25,0 \pm 0,0	26,0 \pm 0,0	6,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
40/03	24,0 \pm 0,0	23,5 \pm 0,7	23,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	20,5 \pm 2,1	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
160/03	24,5 \pm 2,1	26,0 \pm 1,4	24,5 \pm 0,7	0,0 \pm 0,0	16,5 \pm 0,7	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
553/05	27,5 \pm 0,7	27,5 \pm 0,7	24,5 \pm 0,7	0,0 \pm 0,0	15,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
10/06	20,0 \pm 1,4	21,0 \pm 0,0	19,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	7,0 \pm 1,4	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
233/01	28,0 \pm 1,4	27,5 \pm 0,7	25,5 \pm 0,7	0,0 \pm 0,0	9,5 \pm 0,7	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
8010	27,5 \pm 0,7	26,0 \pm 0,0	29,0 \pm 1,4	0,0 \pm 0,0	15,0 \pm 7,1	0,0 \pm 0,0	8,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
6217	42,5 \pm 0,7	35,5 \pm 0,7	30,5 \pm 0,7	10,0 \pm 0,0	6,0 \pm 0,0	10,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
6218	22,0 \pm 0,0	26,0 \pm 1,4	20,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
6221	32,0 \pm 0,0	37,5 \pm 0,7	30,5 \pm 3,5	0,0 \pm 0,0	22,5 \pm 3,5	6,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
658/02	20,0 \pm 0,0	19,5 \pm 2,1	22,5 \pm 0,7	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
699/02	23,0 \pm 0,0	22,5 \pm 0,7	22,5 \pm 0,7	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
$\bar{x} \pm SD$	25,7 \pm 5,1	25,6 \pm 4,4	23,3 \pm 3,5	0,8 \pm 2,6	7,6 \pm 7,9	0,8 \pm 2,6	0,4 \pm 1,8	0,0 \pm 0,0
Rango	20,0 – 42,5	19,5 – 37,5	19,0 – 30,5	0,0 – 10,0	0,0 – 22,5	0,0 – 10,0	0,0 – 8,0	0,0 – 0,0

*Grupos de homogeneidad $P < 0,05$.

Anexo 3. Capítulo 6 - Segundo Objetivo. Resultados del estudio de susceptibilidad *in vitro* de las 60 cepas de *S. suis* a los aceites esenciales estudiados (CMI, Concentración Mínima Inhibitoria en µg/ml; CMB, Concentración Mínima Bactericida en µg/ml). Descripción del valor máximo obtenido en los 3 ensayos.

Referencia	Ensayo	Canela		Cinamaldehído		Orégano		Carvacrol		Tomillo vulgar		Tomillo rojo		Timol	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
1	638/03	1	625,00	625,00	156,25	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	156,25	156,25
		2	625,00	625,00	156,25	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	78,13	156,25
		3	625,00	625,00	156,25	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	78,13	156,25
		Máximo	625,00	625,00	156,25	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	156,25	156,25
2	P1/7	1	625,00	625,00	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50	156,25	156,25
		2	625,00	625,00	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50	156,25	156,25
		3	625,00	625,00	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50	156,25	156,25
		Máximo	625,00	625,00	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50	156,25	156,25
3	235/02	1	625,00	625,00	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		2	625,00	625,00	156,25	156,25	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		3	625,00	625,00	156,25	156,25	156,25	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		Máximo	625,00	625,00	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
4	365/03	1	625,00	625,00	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		2	625,00	625,00	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		3	625,00	625,00	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		Máximo	625,00	625,00	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
5	682/06	1	625,00	625,00	156,25	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50	156,25	156,25
		2	625,00	625,00	156,25	312,50	156,25	156,25	78,13	78,13	156,25	156,25	312,50	78,13	78,13
		3	625,00	625,00	156,25	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50	78,13	78,13
		Máximo	625,00	625,00	156,25	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50	156,25	156,25
6	123/11	1	625,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		2	625,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		3	625,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		Máximo	625,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
7	93/05	1	625,00	625,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		2	625,00	1250,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		3	625,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		Máximo	625,00	1250,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25

Continuación Anexo 3.

Referencia	Ensayo	Canela		Cinamaldehído		Orégano		Carvacrol		Tomillo vulgar		Tomillo rojo		Timol	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
8	203/05	1	625,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		2	625,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		3	625,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		Máximo	625,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
9	225/00	1	625,00	625,00	156,25	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		2	625,00	625,00	156,25	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		3	625,00	625,00	156,25	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		Máximo	625,00	625,00	156,25	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
10	14/03	1	625,00	625,00	156,25	156,25	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		2	625,00	625,00	156,25	156,25	312,50	78,13	78,13	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		3	625,00	625,00	156,25	156,25	312,50	78,13	78,13	156,25	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		Máximo	625,00	625,00	156,25	156,25	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
11	636/03	1	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50	78,13	78,13
		2	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	78,13	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	78,13	78,13
		3	312,50	625,00	156,25	156,25	156,25	78,13	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	78,13	78,13
		Máximo	312,50	625,00	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50	78,13	78,13
12	196/05	1	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	78,13	78,13
		2	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	78,13	78,13
		3	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	78,13	78,13
		Máximo	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	78,13	78,13
13	792/02	1	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		2	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		3	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		Máximo	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
14	633/99	1	1250,00	2500,00	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	625,00	312,50	625,00	156,25	156,25
		2	1250,00	2500,00	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	625,00	312,50	625,00	78,13	78,13
		3	1250,00	2500,00	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		Máximo	1250,00	2500,00	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	625,00	312,50	625,00	156,25	156,25

Continuación Anexo 3.

Referencia	Ensayo	Canela		Cinamaldehído		Orégano		Carvacrol		Tomillo vulgar		Tomillo rojo		Timol		
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	
15	5215	1	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		2	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		3	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		Máximo	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
16	316/12	1	1250,00	2500,00	625,00	625,00	312,50	312,50	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	625,00	156,25	156,25
		2	1250,00	2500,00	625,00	625,00	312,50	312,50	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	625,00	156,25	156,25
		3	1250,00	2500,00	625,00	625,00	312,50	312,50	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	625,00	156,25	156,25
		Máximo	1250,00	2500,00	625,00	625,00	312,50	312,50	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	625,00	156,25	156,25
17	22/02	1	625,00	625,00	312,50	625,00	156,25	156,25	78,13	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		2	625,00	1250,00	312,50	625,00	156,25	156,25	78,13	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		3	625,00	625,00	312,50	625,00	156,25	156,25	78,13	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		Máximo	625,00	1250,00	312,50	625,00	156,25	156,25	78,13	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
18	204/03	1	625,00	1250,00	156,25	156,25	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		2	625,00	1250,00	156,25	156,25	156,25	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		3	625,00	625,00	156,25	156,25	156,25	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		Máximo	625,00	1250,00	156,25	156,25	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
19	26/03	1	625,00	625,00	156,25	156,25	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		2	625,00	625,00	156,25	156,25	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		3	625,00	625,00	156,25	156,25	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		Máximo	625,00	625,00	156,25	156,25	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
20	40/03	1	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25
		2	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25
		3	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25
		Máximo	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25
21	160/03	1	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50	156,25	156,25
		2	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		3	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		Máximo	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25

Continuación Anexo 3.

Referencia	Ensayo	Canela		Cinamaldehído		Orégano		Carvacrol		Tomillo vulgar		Tomillo rojo		Timol	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
22	553/05	1	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	78,13	78,13
		2	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	78,13	78,13
		3	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	78,13	78,13
		Máximo	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	78,13	78,13
33	3144	1	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		2	1250,00	1250,00	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		3	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		Máximo	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
24	8010	1	625,00	625,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		2	625,00	625,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	78,13	156,25
		3	625,00	625,00	156,25	156,25	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		Máximo	625,00	625,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
25	233/01	1	625,00	625,00	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		2	625,00	625,00	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		3	625,00	625,00	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		Máximo	625,00	625,00	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
26	10/06	1	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		2	1250,00	1250,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		3	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		Máximo	1250,00	1250,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
27	228/06	1	625,00	625,00	625,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	625,00	312,50	312,50	312,50	312,50	312,50
		2	625,00	625,00	625,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	625,00	312,50	312,50	312,50	312,50	312,50
		3	625,00	625,00	625,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	625,00	312,50	312,50	312,50	312,50	312,50
		Máximo	625,00	625,00	625,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	625,00	312,50	312,50	312,50	312,50	312,50
28	34/11	1	625,00	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		2	625,00	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		3	625,00	625,00	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		Máximo	625,00	625,00	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25

Continuación Anexo 3.

Referencia	Ensayo	Canela		Cinamaldehído		Orégano		Carvacrol		Tomillo vulgar		Tomillo rojo		Timol		
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	
29	746/02	1	625,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		2	625,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		3	625,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		Máximo	625,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
30	340/05	1	625,00	625,00	625,00	1250,00	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		2	625,00	625,00	625,00	1250,00	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		3	625,00	625,00	625,00	1250,00	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		Máximo	625,00	625,00	625,00	1250,00	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
31	546/05	1	625,00	1250,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		2	625,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		3	625,00	1250,00	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		Máximo	625,00	1250,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
32	232/06	1	625,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		2	625,00	625,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		3	625,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		Máximo	625,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
33	5225	1	625,00	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		2	625,00	625,00	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		3	625,00	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		Máximo	625,00	625,00	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
34	609/02	1	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		2	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		3	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		Máximo	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
35	668/02	1	1250,00	1250,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	156,25
		2	1250,00	1250,00	156,25	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	156,25
		3	1250,00	1250,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	156,25
		Máximo	1250,00	1250,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	156,25

Continuación Anexo 3.

Referencia	Ensayo	Canela		Cinamaldehído		Orégano		Carvacrol		Tomillo vulgar		Tomillo rojo		Timol		
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	
36	724/02	1	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		2	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		3	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		Máximo	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
37	226/03	1	625,00	625,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		2	625,00	1250,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		3	625,00	1250,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		Máximo	625,00	1250,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
38	592/06	1	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		2	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		3	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		Máximo	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
39	261/12	1	1250,00	1250,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	625,00	156,25	156,25
		2	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		3	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		Máximo	1250,00	1250,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	625,00	156,25	156,25
40	20/17	1	312,50	312,50	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25
		2	312,50	312,50	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	156,25	312,50	156,25	156,25
		3	312,50	312,50	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	156,25	156,25
		Máximo	312,50	312,50	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	156,25	156,25
41	36/12	1	1250,00	1250,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	625,00	312,50	625,00	156,25	156,25
		2	1250,00	1250,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	625,00	156,25	156,25
		3	1250,00	1250,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	625,00	156,25	156,25
		Máximo	1250,00	1250,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	625,00	312,50	625,00	156,25	156,25
42	574/02	1	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	625,00	156,25	156,25
		2	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	625,00	156,25	156,25
		3	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	625,00	156,25	156,25
		Máximo	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	625,00	156,25	156,25

Continuación Anexo 3.

Referencia	Ensayo	Canela		Cinamaldehído		Orégano		Carvacrol		Tomillo vulgar		Tomillo rojo		Timol		
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	
43	273/12	1	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	625,00	156,25	156,25
		2	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	625,00	312,50	625,00	156,25	156,25
		3	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	625,00	156,25	156,25
		Máximo	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	625,00	312,50	625,00	156,25	156,25
44	341/12	1	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	312,50	625,00	625,00	625,00	625,00	156,25	156,25
		2	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	312,50	625,00	625,00	625,00	625,00	156,25	156,25
		3	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	312,50	625,00	625,00	625,00	625,00	156,25	156,25
		Máximo	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	312,50	625,00	625,00	625,00	625,00	156,25	156,25
45	6217	1	625,00	625,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		2	625,00	625,00	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		3	625,00	625,00	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		Máximo	625,00	625,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
46	338/12	1	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	625,00	625,00	625,00	625,00	156,25	156,25
		2	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	625,00	625,00	156,25	156,25
		3	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	625,00	625,00	156,25	156,25
		Máximo	1250,00	1250,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	625,00	625,00	625,00	625,00	156,25	156,25
47	6218	1	625,00	625,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		2	625,00	625,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		3	625,00	625,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		Máximo	625,00	625,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
48	10/17	1	312,50	625,00	625,00	625,00	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25
		2	312,50	625,00	625,00	625,00	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	312,50	156,25	312,50	156,25	156,25
		3	312,50	625,00	625,00	625,00	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
		Máximo	312,50	625,00	625,00	625,00	312,50	312,50	156,25	312,50	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25
49	269/12	1	1250,00	1250,00	156,25	156,25	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	156,25
		2	1250,00	1250,00	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		3	1250,00	1250,00	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	156,25
		Máximo	1250,00	1250,00	156,25	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	156,25

Continuación Anexo 3.

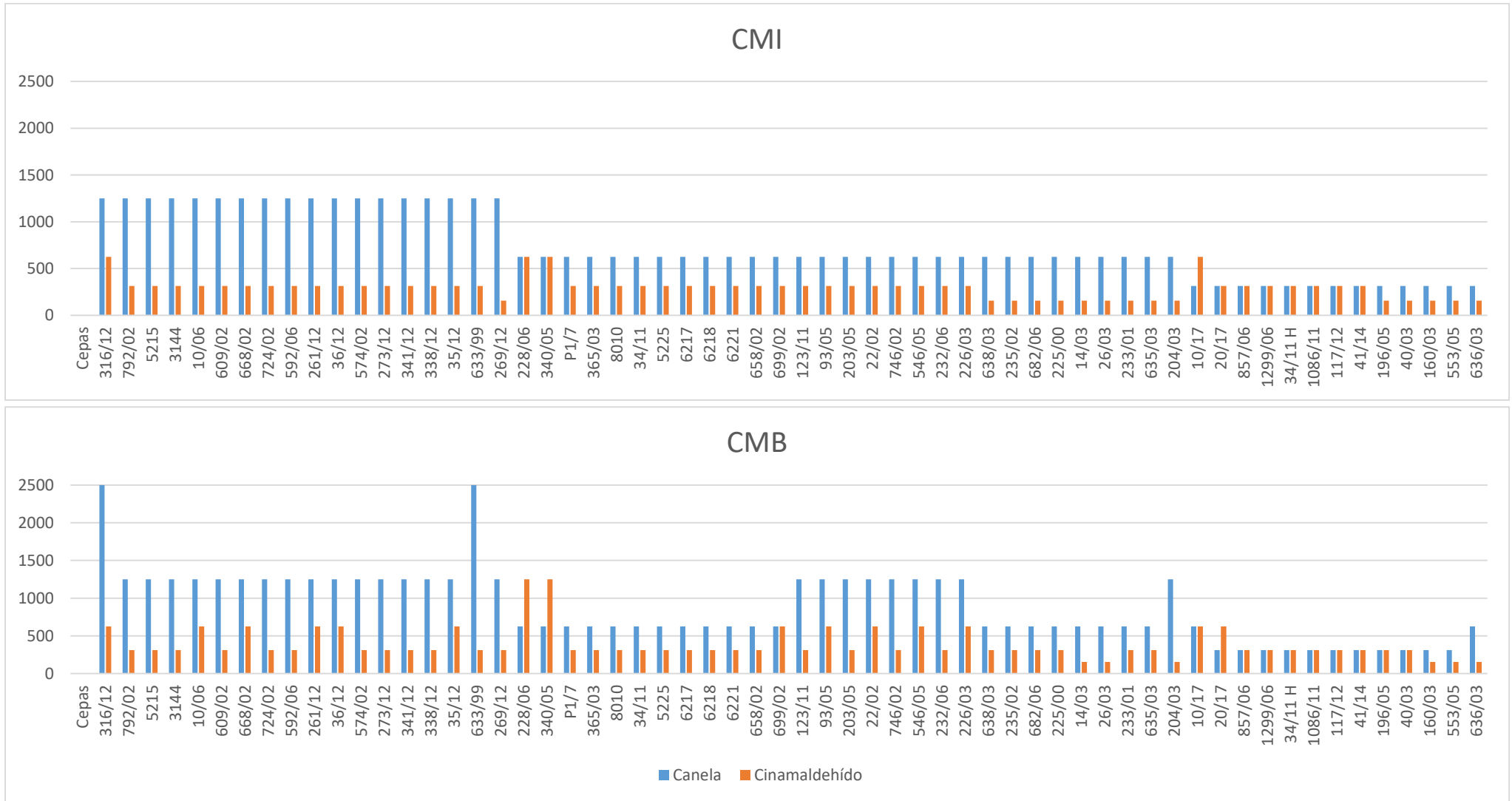
Referencia	Ensayo	Canela		Cinamaldehído		Orégano		Carvacrol		Tomillo vulgar		Tomillo rojo		Timol		
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	
50	6221	1	625,00	625,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	156,25
		2	625,00	625,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		3	625,00	625,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	625,00	625,00	78,13	156,25
		Máximo	625,00	625,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	625,00	625,00	78,13	156,25
51	35/12	1	1250,00	1250,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	625,00	156,25	156,25
		2	1250,00	1250,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	625,00	156,25	156,25
		3	1250,00	1250,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	625,00	156,25	156,25
		Máximo	1250,00	1250,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	625,00	156,25	156,25
52	635/03	1	625,00	625,00	156,25	312,50	156,25	156,25	78,13	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50	78,13	78,13
		2	625,00	625,00	156,25	312,50	156,25	156,25	78,13	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50	78,13	78,13
		3	625,00	625,00	156,25	312,50	156,25	156,25	78,13	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50	78,13	78,13
		Máximo	625,00	625,00	156,25	312,50	156,25	156,25	78,13	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50	78,13	78,13
53	658/02	1	625,00	625,00	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		2	625,00	625,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		3	625,00	625,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		Máximo	625,00	625,00	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
54	699/02	1	625,00	625,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		2	625,00	625,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	625,00	78,13	78,13
		3	625,00	625,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	312,50	78,13	78,13
		Máximo	625,00	625,00	312,50	625,00	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	312,50	625,00	78,13	78,13
55	857/06	1	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50
		2	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50
		3	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50
		Máximo	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50
56	1299/06	1	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25
		2	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25
		3	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25
		Máximo	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25

Continuación Anexo 3.

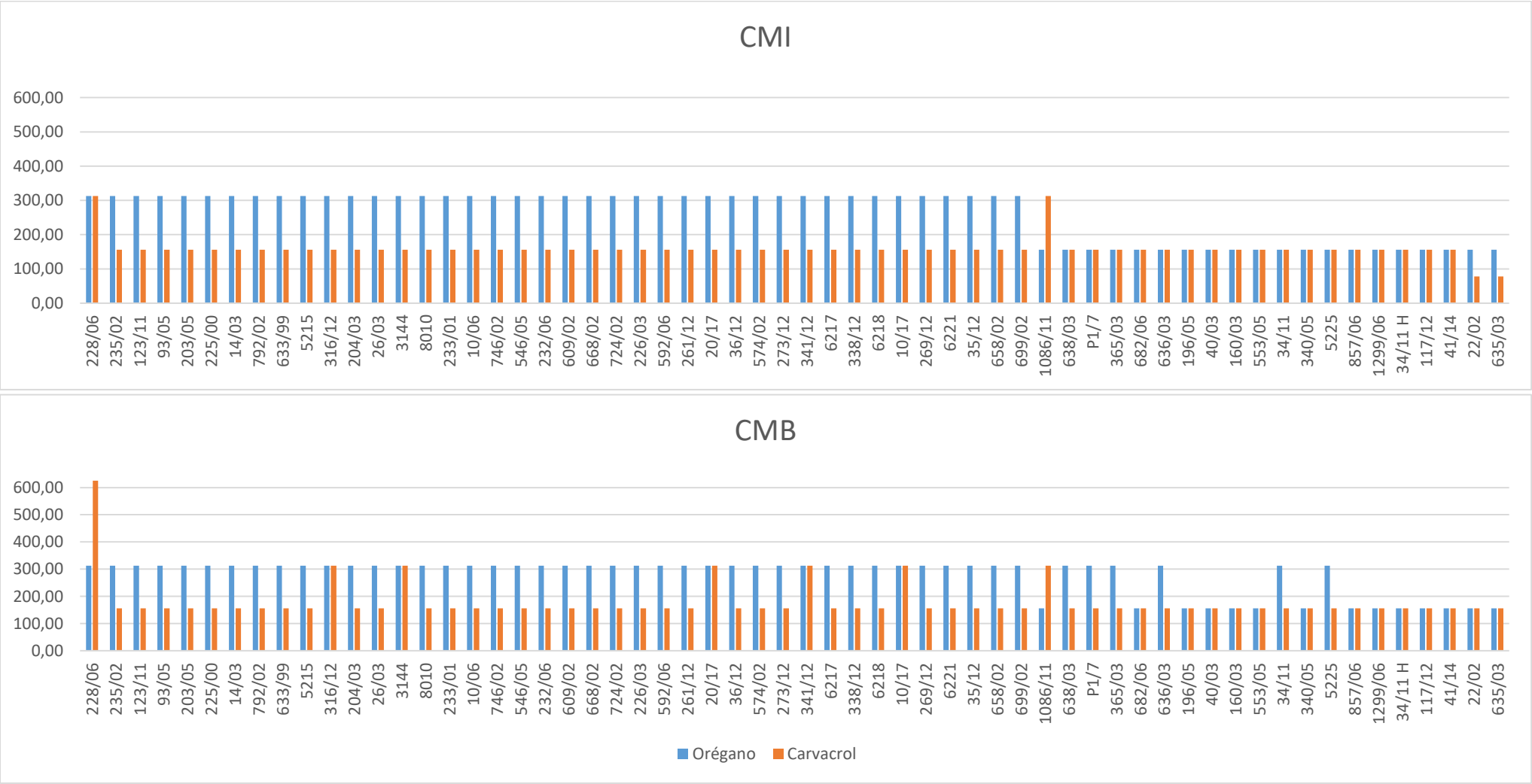
Referencia	Ensayo	Canela		Cinamaldehído		Orégano		Carvacrol		Tomillo vulgar		Tomillo rojo		Timol	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
57	34/11 H	1	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50
		2	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50
		3	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50
		Máximo	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50
58	1086/11	1	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50
		2	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50
		3	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50
		Máximo	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50
59	117/12	1	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50
		2	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50
		3	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50
		Máximo	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50
60	41/14	1	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50
		2	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50
		3	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50
		Máximo	312,50	312,50	312,50	312,50	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	312,50	312,50

Anexo 4. Capítulo 6 - Segundo Objetivo

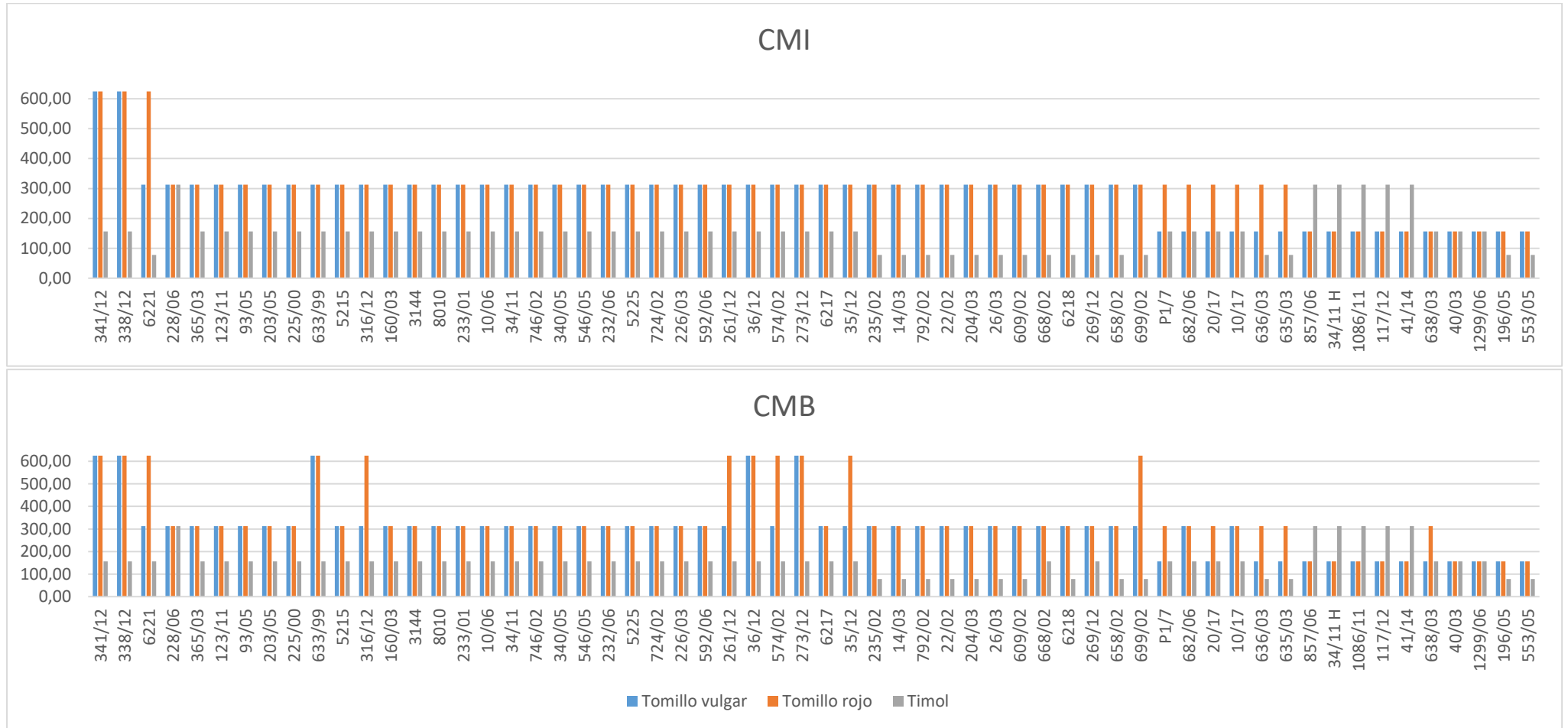
4.1. Resultados de CMI y CMB para la canela y el cinamaldehído.



4.2. Resultados de CMI y CMB para el orégano y carvacrol.

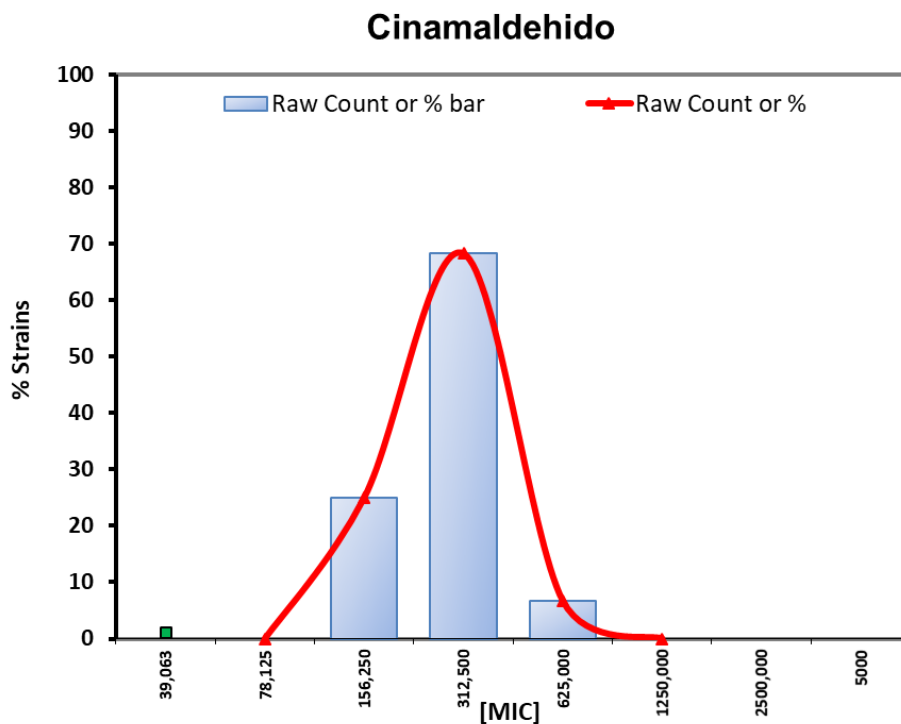
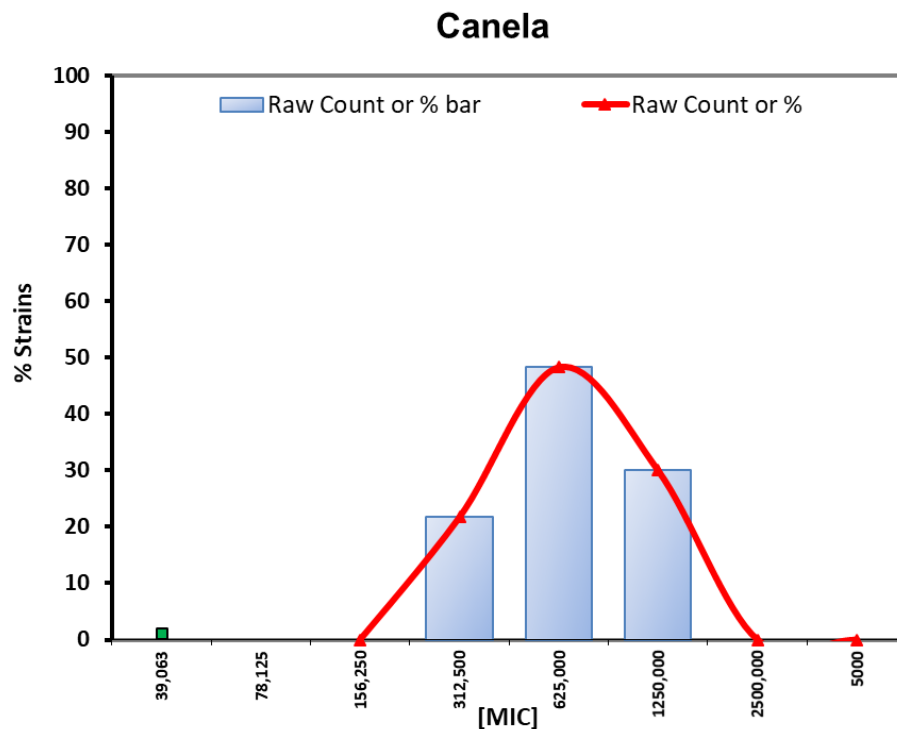


Anexo 4.3. Resultados de CMI y CMB para tomillo vulgar, tomillo rojo y timol.

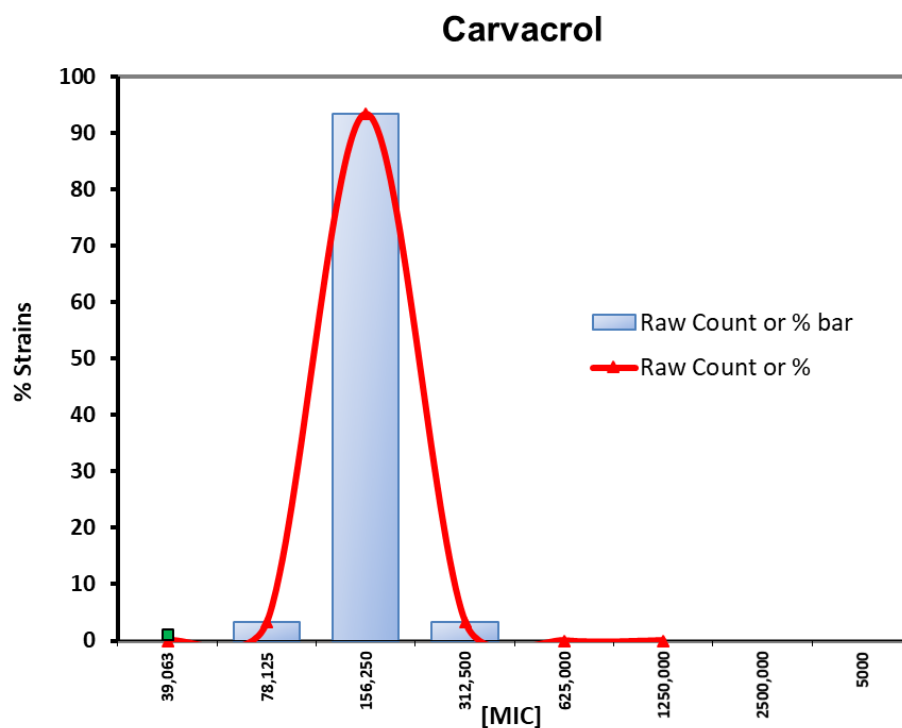
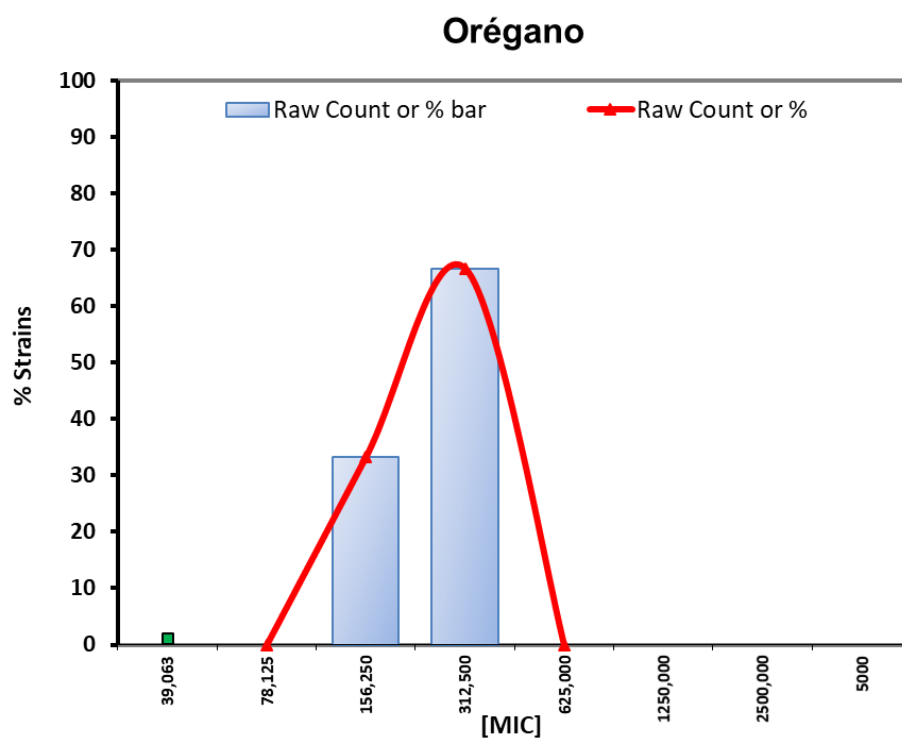


Anexo 5. Capítulo 6 - Segundo Objetivo

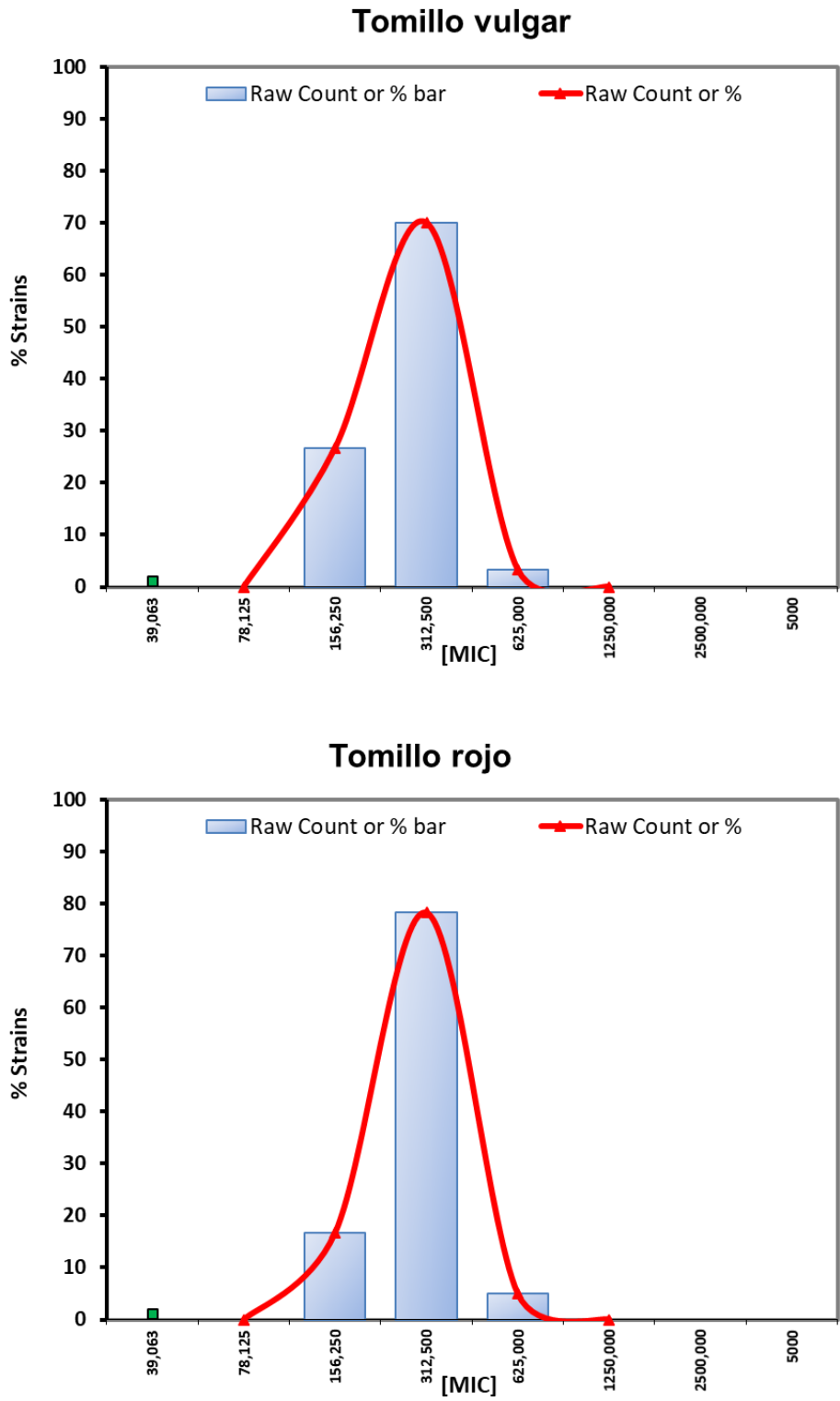
5.1. Porcentajes acumulados obtenidos a partir de la distribución de frecuencias de las CMIs obtenidas con las 60 cepas para la canela y cinamaldehído (ECOFFinder, EUCAST).



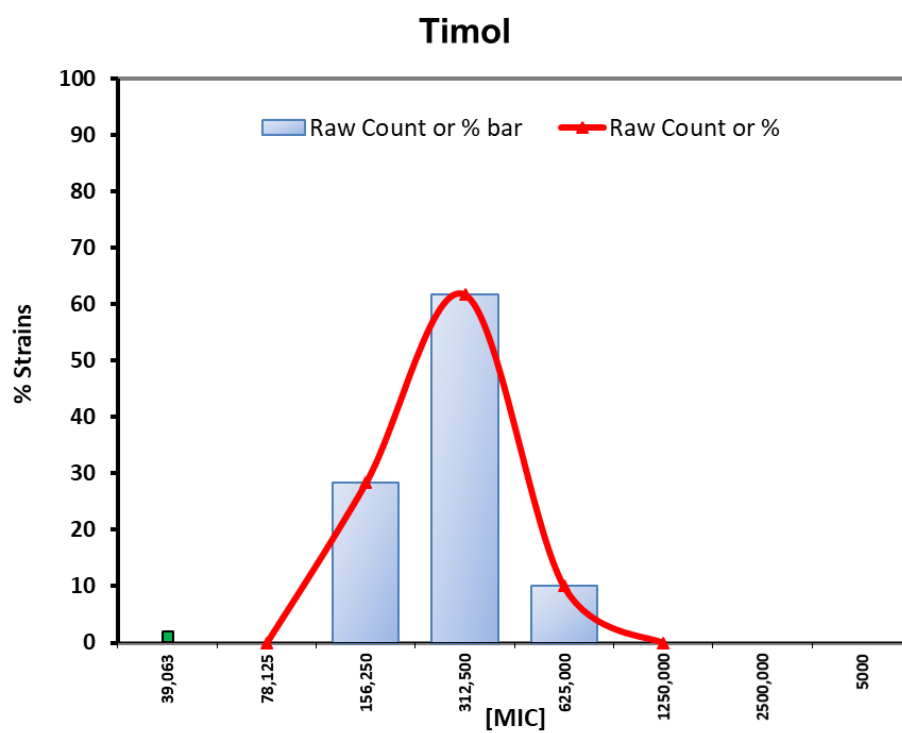
5.2. Porcentajes acumulados obtenidos a partir de la distribución de frecuencias de las CMI_s obtenidas con las 60 cepas para el orégano y carvacrol (ECOFFinder, EUCAST).



5.3. Porcentajes acumulados obtenidos a partir de la distribución de frecuencias de las CMI_s obtenidas con las 60 cepas para tomillo vulgar, tomillo rojo y timol. (ECOFFinder, EUCAST).



Continuación Anexo 5.3.



ORIGINAL RESEARCH

Antimicrobial activity of selected essential oils against *Streptococcus suis* isolated from pigs

Fabiana C. de Aguiar  | Ana Lucía Solarte | Carmen Tarradas | Inmaculada Luque | Alfonso Maldonado | Ángela Galán-Relaño | Belén Huerta

Departamento de Sanidad Animal,
Universidad de Córdoba, International
Excellence Agrifood Campus 'CeIA3',
Córdoba, Spain

Correspondence

Belén Huerta
Departamento de Sanidad Animal, Campus
Universitario de Rabanales, Córdoba, Spain.
Email: sa2hulob@uco.es

Funding information

Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior – CAPES

Abstract

The inhibitory potential by contact and vapor of basil, cinnamon, clove, peppermint, oregano, rosemary, common thyme, and red thyme essential oils (EOs) against 20 strains of *Streptococcus suis* was determined by the disk diffusion test. The broth microdilution method was used to determine the minimal inhibitory and minimal bactericidal concentration (MIC and MBC) of the four selected oils. Furthermore, the bactericidal power (ratio MBC/MIC) was calculated. The EOs with the major potential in the disk diffusion method were red thyme, common thyme, oregano, and cinnamon (\varnothing mean 16.5–34.2 mm), whereas cinnamon did not show vapor activity. In the microdilution test, all the EOs showed notable antimicrobial activity (MIC₉₀ and MBC₉₀ 312.5–625 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and a strong bactericidal power (ratio = 1). This is the first study that selects essential oils against *S. suis*. New studies about the possible synergic effect of EOs with antibiotics and about toxicity and efficacy in in vivo conditions are recommended.

KEYWORDS

antimicrobial activity, essential oils, MIC, *Streptococcus suis*, vapor

1 | INTRODUCTION

Streptococcus suis is a major gram-positive swine pathogen associated with a wide variety of pig diseases, such as meningitis, arthritis, bronchopneumonia, endocarditis, polyserositis, and septicemia. In addition, it is a zoonotic agent that causes severe infections in people in close contact with infected pigs or pork-derived products. According to the capsular polysaccharide, 33 serotypes of *S. suis* have been described with serotypes 1–10 (except 6) and 14, 15, 16, 1/2, and 1/14 being the most prevalent and virulent ones for pigs (Goyette-Desjardins, Auger, Xu, Segura, & Gottschalk, 2014; Tarradas et al., 2004). The control of the disease is nowadays based on the antibiotic therapy; however, relatively high levels of resistance (up to 85%) to some antimicrobials commonly used in swine, including lincosamides, macrolides, sulfonamides, and tetracycline, has been worldwide documented (Varela

et al., 2013). Different strategies to reduce the use of antimicrobials have been proposed and natural products with antimicrobial effects can be an attractive alternative (Manzanilla et al., 2004).

Essential oils (EOs) are extracts of plants prepared by steam distillation and are generally composed of a combination of substances like terpenes, phenolics, aldehydes, or alcohols, the most of which are volatile (Laird & Phillips, 2012). EOs can affect bacterial permeability and survival, either by direct contact or by contact with their vapor (Martinez & Baquero, 2000; Nazzaro, Fratianni, De Martino, Coppola, & De Feo, 2013). The volatile nature of essential oils could also have a direct application in food preservation and surface disinfection (Laird & Phillips, 2012). The complex composition and different mechanisms of action of EOs may be an advantage over other antimicrobials to prevent the development of resistance of pathogenic bacteria (Knezevic et al., 2016; Yap, Yiap, Ping, & Lim, 2014).

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2018 The Authors. *MicrobiologyOpen* published by John Wiley & Sons Ltd.

Essential oils have an acceptable activity against gram-positive and gram-negative bacteria of interest in human and veterinary medicine, such as *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and different species of Genus *Streptococcus* of human origin: *S. mutans*, *S. pyogenes*, and *S. salivarius*. In vitro studies have highlighted the activity of oregano, thyme, peppermint, and cinnamon oils against these bacteria (Freires, Denny, Benso, de Alencar, & Rosalen, 2015; Galvão et al., 2012; Sfeir, Lefrancois, Baudoux, Derbre, & Licznar, 2013). Nevertheless, in all those studies, a limited number of clinical isolates have been analyzed, and there are few studies showing susceptibility of *S. suis* to EOs.

In this way, the objectives of this study were to evaluate the in vitro activity of eight essential oils, by direct contact and by contact with the oils vapors, against field isolates of *S. suis* of the most important serotypes for swine and humans, and to determine the susceptibility of this microorganism to the four oils with the best antimicrobial potential by means of MIC and MBC determination.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Bacterial strains

A total of 19 *S. suis* strains from Culture Collection of Animal Health Department (University of Cordoba, Spain) and Central Veterinary Institute of Wageningen (Lelystad, Netherlands) were studied. All the strains had been isolated from diseased and healthy carrier pigs submitted to these centers, and belonged to different serotypes (serotypes 1, 2, 3, 4, 8, 9, 24, 25, 28, and 1/14). In addition, the European reference strain of *S. suis* (p 1/7) was included in this study. *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 reference strain was used as quality control. The selected isolates were stored at -80°C in Microbank® beads (Prolab diagnostics Co., UK) and were grown in Mueller Hinton agar (MHA) supplemented with 5% defibrinated sheep blood (Oxoid Ltd, ES).

2.2 | Essentials oils

Eight commercial EOs (purity $\geq 98\%$) were purchased from Aromium® (Barcelona, ES), the purity and composition of which was determined by the manufacturer. The list of essential oils and their properties are given in Table 1. All the oils were stored at room temperature in the dark prior to testing.

2.3 | Antimicrobial activity assays

As a preliminary step, the antibacterial activity of the essential oils was determined by the disk diffusion method, following the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI VET01-A4, 2013) for the disk diffusion test with antibiotics, including the modifications proposed for essential oils (Huerta et al., 2016). Briefly, from an overnight culture, a suspension of 1.5×10^8 CFU·mL⁻¹ was prepared in sterile saline solution, and inoculated onto a plate of MHA with 5% defibrinated sheep blood. A sterile 6 mm diameter

white disk (Oxoid Ltd, ES), previously impregnated with 15 μL of pure essential oil, was placed onto every plate and once sealed with parafilm, plates were incubated in a 5% CO₂-enriched atmosphere at 35°C for 20–24 hr.

Furthermore, the effect of the volatile fraction of every EO was studied with the inverted Petri dish method (Maruzzella & Sicurella, 1960; Ross, O'Gara, Hill, Sleightholme, & Maslin, 2001), placing the disk impregnated with 15 μL of each EO in the lid of MHA with 5% defibrinated sheep blood and incubating under the conditions named before.

The antibacterial activity was evaluated by measuring in millimeters the diameter of the inhibitory zone. All experiments were conducted in triplicate and the mean \pm SD was calculated for each strain. The standard reference penicillin (Sigma Aldrich Co.; Madrid, ES) was used as reference control for the tested bacteria. Inoculum concentration was checked by viable counts in MHA with 5% defibrinated sheep blood.

2.4 | Determination of minimal inhibitory and bactericidal concentrations

The essential oils with the major antimicrobial activity in the paper disk diffusion assay were selected to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) and the minimal bactericidal concentration (MBC), using the broth dilution method for bacteria isolated from animals (CLSI VET01-A4, 2013). To facilitate the dilution of the oils and the reading of the results, Brain-Heart Infusion broth supplemented with 0.15% agar was used (Oxoid Ltd, ES) (Mann & Markham, 1998). The microdilution broth technique was performed as follows: double serial dilutions of selected EOs were prepared ranging from 5,000 to 39.0625 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; in a 96 well microtiter plate, 100 μL of each EO dilution was mixed with 100 μL of bacterial suspension (10^6 CFU·mL⁻¹). Then, the plate was incubated at 35°C for 20–24 hr under aerobic conditions. Every assay was carried out in triplicate. Positive (oil-free broth with bacterial inoculum) and negative (oil-free broth without bacterial inoculum) controls were included (Bajpai, Baek, & Kang, 2012; Huerta et al., 2016). Penicillin G (Sigma Aldrich Co.; Madrid, ES) was used as quality control.

The MIC was the lowest concentration that prevented the visible growth of *S. suis*. The MBC was determined by subculturing 10 μL from the last four wells without visible bacterial growth onto MHA with 5% defibrinated sheep blood. After incubation at 35°C for 20–24 hr 5% CO₂-enriched atmosphere, MBC was defined as the lowest concentration resulting in a negative subculture or giving presence of only one colony after incubation. All assays were performed in triplicate.

2.5 | Statistical analysis

A statistical package SPSS 15.0 for Windows (SPSS Inc, USA) was used for the data processing. The diameter of inhibitory zones and MICs and MBCs results were grouped according to oil type and checked for normality by Shapiro–Wilk test.

TABLE 1 Essential oils tested and their properties

Essential oil	Common name	Family	Main composition [%] ^a
<i>Ocimum basilicum</i>	Basil	Lamiaceae	Estragole [83.34], eucalyptol [3.34], bergamotene [2.58], linalool [0.89]
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (bark)	Cinnamon	Lauraceae	Cinnamaldehyde [69.18], linalool [3.19], eugenol [3.03]
<i>Eugenia caryophyllata</i>	Clove	Myrtaceae	Eugenol [85–90], eugenyl acetate [5–10], caryophyllene [0–5]
<i>Mentha piperita</i>	Peppermint	Lamiaceae	Menthol [50–55], menthone [20–25], eucalyptol [5–10], menthyl acetate [5–10]
<i>Origanum vulgare</i>	Oregano	Lamiaceae	Carvacrol [63.01], thymol [10.56], γ -terpinene [8.11]
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Rosemary	Lamiaceae	α -Pinene + α -thuyene [22.75], 1.8 cineol [20.63], camphor [18.78]
<i>Thymus vulgaris</i>	Common thyme	Lamiaceae	Thymol ^{NA} , p-cymene ^{NA} , linalool ^{NA}
<i>Thymus zygis</i>	Red thyme	Lamiaceae	Thymol [46.9], p-cymene [21.72], γ -terpinene [9.32], linalool [4.8]

NA, Not available.

^aBased on the data provided by manufacturer.

The repeated-measures ANOVA test was used for the selection of the four essential oils with the highest antimicrobial potential in the disk diffusion assay, whereas differences between EOs were estimated by comparison of main effects. The results obtained allowed to establish groups of homogeneity depending on the similarity of the antimicrobial activity. MIC and MBC values were treated as ordinal numerical variables. Comparison of the four selected EOs was performed by the nonparametric tests of Friedman and Wilcoxon and allowed the establishment of groups. Significance was set at $p < .05$.

The concentration that inhibited and killed the 50% and 90% of the tested strains (MIC₅₀ and MIC₉₀, MBC₅₀, and MBC₉₀, respectively) was determined for the selected EOs. Microcidal power was calculated by MBC/MIC ratio of the previous parameters and interpreted based on the criteria of Schwarz et al. (2010) and Radhakrishnan, Gnanamani, and Mandal (2011).

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | Antimicrobial activity of the eight essential oils analyzed

Essential oils and plants extracts have been traditionally used in human medicine for their anti-inflammatory, antimicrobial, and immunomodulatory properties (Inouye, Takizawa, & Yamaguchi, 2001; Shaaban, El-Ghorab, & Shibamoto, 2012). Currently, EOs have been authorized as food additives and their antimicrobial activity is analyzed to be used as disinfectants and a possible alternative to the

antibiotic therapy in human and veterinary medicine, especially for diseases caused by multidrug-resistant microorganisms (Laird & Phillips, 2012; Lv, Liang, Yuan, & Li, 2011).

In our study, almost every EO exhibited good antimicrobial activity against *S. suis* (Tables 2 and S1). The oils with a significantly higher inhibitory activity were red thyme and common thyme (\emptyset mean of inhibition zone 34.2 and 33.2 mm, respectively), followed by oregano (\emptyset mean of inhibition zone 29.4 mm). Cinnamon, peppermint, and clove (\emptyset mean 16.5, 16.4, and 15.8-mm, respectively) showed a similar antimicrobial potential, although it was significantly lower than the previous ones. A weak or nonexistent activity of basil and rosemary was observed. It has been possible to establish five homogeneous groups of EOs, according to the results obtained in the disk diffusion test (Tables 2 and S1).

Red thyme, common thyme, oregano, and cinnamon have showed the best antimicrobial potential in the qualitative assay against the field isolates of *S. suis*, including the European reference strain P1/7. According to the classification proposed by Lv et al. (2011), red thyme, common thyme, and oregano would have a strong activity (inhibition zone ≥ 20 mm) and cinnamon, a moderate one (inhibition zone between 12 and 20 mm). These EOs have also shown a good antimicrobial activity against a wide variety of microbial pathogens involved in different clinical processes of both humans and animals, including other *Streptococcus* species (Fabio, Cermelli, Fabio, Nicoletti, & Quaglio, 2007; Galvão et al., 2012; Sfeir et al., 2013). Taking into account these preliminary results, red thyme, common thyme, oregano, and cinnamon essential oils were selected for the quantitative study.

Essential oil		Disk diffusion		Vapor contact	
		Mean \pm SD	Range	Mean \pm SD	Range
Groups* I	Red thyme	34.2 \pm 8.2	24.3–49.3	25.7 \pm 5.1	20.0–42.5
	Common thyme	33.2 \pm 7.3	24.0–49.0	25.6 \pm 4.4	19.5–37.5
Group II	Oregano	29.4 \pm 5.8	22.0–40.3	23.3 \pm 3.5	19.0–30.5
Group III	Cinnamon	16.5 \pm 5.2	6.0–27.0	0.8 \pm 2.6	0.0–10.0
	Peppermint	16.4 \pm 6.8	9.0–36.3	7.6 \pm 7.9	0.0–22.5
	Clove	15.8 \pm 5.0	6.0–28.0	0.8 \pm 2.6	0.0–10.0
Group IV	Rosemary	10.3 \pm 2.4	6.3–15.7	0.4 \pm 1.8	0.0–8.0
Group V	Basil	7.1 \pm 1.0	6.0–9.0	0.0 \pm 0.0	0.0–0.0

*The homogeneity groups $p < .05$ in the disk diffusion assay.

We also assessed the possible activity of volatile components of these EOs, since they may have a great antimicrobial potential to be used in respiratory pathologies treatment and disinfection of facilities, preventing the formation of biofilms (Inouye et al., 2001; Laird & Phillips, 2012). Good activity was obtained from the volatile fraction of thyme (red and common) and oregano (\emptyset mean 23.3–25.7 mm), whereas a limited or absent inhibition was observed for peppermint, basil, rosemary, cinnamon, and clove (Tables 2 and S2).

Despite the great vapor activity of thyme (red and common) and oregano, their inhibition zones were slightly lower than those observed in the direct contact assay. The remaining EOs presented weak or nonexistent antibacterial activity, which disagrees with Inouye et al. (2001), who found good activity of cinnamon and moderate activity of rosemary against *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae*. These differences could be related to the volatility and the absorption of the volatile compounds through the agar (Inouye et al., 2001; Maruzzella & Sicurella, 1960).

3.2 | Minimal inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration

Different studies highlight the usefulness of disk diffusion method as a screening test (Lopez, Sanchez, Batlle, & Nerin, 2005). It may present a weak correlation with the quantitative microdilution technique because of heterogeneity of some oils when diffusing through the agar or their different volatility, depending on the chemical composition or external temperature (Hernandez et al., 2005). The dilution method could be more reliable than the disk method with regards to reproducibility and clinical relevance (Inouye et al., 2001).

The susceptibility of all the *S. suis* isolates analyzed in this study to each EO was similar, suggesting a very homogeneous behavior of *S. suis* against the analyzed essential oils. MIC values ranged from 156.25 to 312.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for oregano and common thyme, from 156.25 to 625 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for red thyme, and from 312.5 to 1250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for cinnamon. The statistical comparison of the distribution of the MIC and the MBC showed significant difference between the oregano and the two thymes (group I) and the cinnamon (group II) (Table S3). These results are in accordance with the classification

TABLE 2 Average \pm standard deviation and range inhibition zone (mm) of disk diffusion and vapor contact tests of the eight tested EOs against 20 isolates of *S. suis*, by homogeneity groups

proposed by Freires et al. (2015): the essential oils with a MIC range of 101–500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ would have a strong activity and the essential oils with a MIC range 501–1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ would have a moderate activity.

However, the values determined for MIC₉₀ and MBC₉₀ only differed in one dilution (312.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for oregano, common thyme, and red thyme and 625 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for cinnamon) (Table 3), and the microcidal power was equal to 1.0 for all the EOs, indicating a notable bactericidal activity for the four essential oils tested against *S. suis*. Other gram-positive bacteria (*Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp.), including multiresistant isolates, have also showed a notable antimicrobial activity of oregano and thyme (Fabio et al., 2007; Lv et al., 2011).

The absence of bacterial resistance described against EOs is considered to be the main advantage of these products in comparison with other antimicrobial agents (Knezevic et al., 2016). Nevertheless, EOs studies in cell cultures show a dose-dependent cytotoxic effect, described as an increased apoptosis and cellular necrosis (Dusan, Marian, Katarina, & Dobroslava, 2006). The nontoxic concentration described by Fabio et al. (2007) for thyme is near to the minimal inhibitory concentrations (MIC₉₀ and MBC₉₀) obtained in our study. However, the nontoxic concentration of cinnamon that they publish was lower than our values. Several studies have shown synergistic effect between the essential oils tested in this work and some traditional antimicrobials, with a notable decrease in the effective concentration (Solarte et al., 2017).

TABLE 3 Minimal inhibitory concentration (MIC) 50 and 90 and minimal bactericidal concentration (MBC) 50 and 90 of the selected essential oils against 20 isolates of *S. suis*

Essential oil	MIC ^a ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)		MBC ^b ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MBC ₅₀	MBC ₉₀
Red thyme	312.5	312.5	312.5	312.5
Common thyme	312.5	312.5	312.5	312.5
Oregano	312.5	312.5	312.5	312.5
Cinnamon	625	625	625	625

^aMIC₅₀ and MIC₉₀: concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) that inhibited the growth of 50% (10/20) and 90% (18/20) of the strains.

^bMBC₅₀ and MBC₉₀: concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) that destroyed 50% (10/20) and 90% (18/20) of the strains.

In vivo studies in pigs with oregano, thyme, and cinnamon generally describe a significant increase in growth performance without altering the quality of the carcass (Namkung et al., 2004; Simitzis, Symeon, Charismiadou, Bizelis, & Deligeorgis, 2010), which is associated with a beneficial effect on the intestinal microbiota, nutrient absorption, and on the action of digestive enzymes (Zeng, Zhang, Wang, & Piao, 2015). However, in some studies, the potential of these EOs was lower than that of the antimicrobial agents (Neill et al., 2006). A notable difference has been shown in the productive effect of EOs according to the type and origin of the essential oil, the quantity added to feed and some intrinsic and extrinsic factors, including age group, gastric pH, the nutritional status, the diet, or the environmental conditions of the trial (Lan, Li, & Kim, 2016).

This is the first study that selects EOs with antimicrobial activity against several *S. suis* strains. The essential oils of oregano, red thyme, common thyme and cinnamon showed a notable in vitro bactericidal activity, by vapor and/or direct contact. The essential oils could be used alone or in combination with antimicrobial agents to control multidrug-resistant bacteria, although more in vivo studies on the safety and the effect of essential oils are needed.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* – CAPES, Brazil.

CONFLICT OF INTEREST

No conflict of interest declared.

ORCID

Fabiana C. de Aguiar  <http://orcid.org/0000-0002-5463-8769>

REFERENCES

- Bajpai, V. K., Baek, K. H., & Kang, S. C. (2012). Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*, 45, 722–734. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.052>
- Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI. (2013). *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals*. (3rd ed.). Wayne, PA: CLSI Document VET01.A4.
- Dusan, F., Marian, S., Katarina, D., & Dobroslava, B. (2006). Essential oils - their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicology in Vitro*, 20, 1435–1445. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.06.012>
- Fabio, A., Cermelli, C., Fabio, G., Nicoletti, P., & Quaglio, P. (2007). Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on microorganisms responsible for respiratory infections. *Phytotherapy Research*, 21, 374–377. [https://doi.org/10.1002/\(ISSN\)1099-1573](https://doi.org/10.1002/(ISSN)1099-1573)
- Freires, I. A., Denny, C., Benso, B., de Alencar, S. M., & Rosalen, P. L. (2015). Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: A systematic review. *Molecules*, 20, 7329–7358. <https://doi.org/10.3390/molecules20047329>
- Galvão, L. C. D., Furletti, V. F., Bersan, S. M. F., da Cunha, M. G., Ruiz, A., de Carvalho, J. E., ... Rosalen, P. L. (2012). Antimicrobial activity of essential oils against *Streptococcus mutans* and their antiproliferative effects. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 751435.
- Goyette-Desjardins, G., Auger, J.-P., Xu, J., Segura, M., & Gottschalk, M. (2014). *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerging Microbes & Infections*, 3, e45. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.45>
- Hernandez, T., Canales, M., Avila, J. G., Garcia, A. M., Martinez, A., Caballero, J., ... Lira, R. (2005). Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana achnanthifolia* Desf. (*Verbenaceae*). *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 551–554. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.09.044>
- Huerta, B., Barrero-Dominguez, B., Galan-Relano, A., Tarradas, C., Maldonado, A., & Luque, I. (2016). Essential oils in the control of infections by *Staphylococcus xylosus* in horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 38, 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.11.011>
- Inouye, S., Takizawa, T., & Yamaguchi, H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47, 565–573. <https://doi.org/10.1093/jac/47.5.565>
- Knezevic, P., Aleksic, V., Simin, N., Svircev, E., Petrovic, A., & Mimica-Dukic, N. (2016). Antibacterial activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Ethnopharmacology*, 178, 125–136. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.12.008>
- Laird, K., & Phillips, C. (2012). Vapour phase: A potential future use for essential oils as antimicrobials? *Letters in Applied Microbiology*, 54, 169–174. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03190.x>
- Lan, R. X., Li, T. S., & Kim, I. H. (2016). Effects of essential oils supplementation in different nutrient densities on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics and fecal microbial shedding in weaning pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 214, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2016.02.011>
- Lopez, P., Sanchez, C., Batlle, R., & Nerin, C. (2005). Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 6939–6946. <https://doi.org/10.1021/jf050709v>
- Lv, F., Liang, H., Yuan, Q., & Li, C. (2011). In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 44, 3057–3064. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.030>
- Mann, C. M., & Markham, J. L. (1998). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 538–544. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00379.x>
- Manzanilla, E. G., Perez, J. F., Martin, M., Kamel, C., Baucells, F., & Gasa, J. (2004). Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 82, 3210–3218. <https://doi.org/10.2527/2004.82113210x>
- Martinez, J. L., & Baquero, F. (2000). Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 1771–1777. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.7.1771-1777.2000>
- Maruzzella, J. C., & Sicurella, N. A. (1960). Antibacterial activity of essential oil vapors. *Journal of the American Pharmacists Association*, 49, 692–694.
- Namkung, H., Li, M., Gong, J., Yu, H., Cottrill, M., & de Lange, C. F. M. (2004). Impact of feeding blends of organic acids and herbal extracts

- on growth performance, gut microbiota and digestive function in newly weaned pigs. *Canadian Journal of Animal Science*, 84, 697–704. <https://doi.org/10.4141/A04-005>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals (Basel)*, 6, 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- Neill, C. R., Nelssen, J. L., Tokach, M. D., Goodband, R. D., DeRouchey, J. M., Dritz, S. S., ... Brown, K. R. (2006). Effects of oregano oil on growth performance of nursery pigs. *Journal of Swine Health and Production*, 14, 312–316.
- Radhakrishnan, N., Gnanamani, A., & Mandal, A. B. (2011). A potential antibacterial agent Embelin, a natural benzoquinone extracted from *Embelia ribes*. *Biology and Medicine*, 3, 1–7.
- Ross, Z. M., O'Gara, E. A., Hill, D. J., Sleightholme, H. V., & Maslin, D. J. (2001). Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: Evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. *Applied and Environment Microbiology*, 67, 475–480. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.475-480.2001>
- Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., van Duijkeren, E., Johnson, A. P., & Gastra, W. (2010). Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Veterinary Microbiology*, 141, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.12.013>
- Sfeir, J., Lefrancois, C., Baudoux, D., Derbre, S., & Licznar, P. (2013). In vitro antibacterial activity of essential oils against *Streptococcus pyogenes*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 269161. <https://doi.org/10.1155/2013/269161>
- Shaaban, H. A. E., El-Ghorab, A. H., & Shibamoto, T. (2012). Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. *Journal of Essential Oil Research*, 24, 203–212. <https://doi.org/10.1080/10412905.2012.659528>
- Simitzis, P. E., Symeon, G. K., Charismiadou, M. A., Bizelis, J. A., & Deligeorgis, S. G. (2010). The effects of dietary oregano oil supplementation on pig meat characteristics. *Meat Science*, 84, 670–676. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.11.001>
- Solarte, A. L., Astorga, R. J., Aguiar, F., Galan-Relano, A., Maldonado, A., & Huerta, B. (2017). Combination of antimicrobials and essential oils as an alternative for the control of *Salmonella enterica* multiresistant strains related to foodborne disease. *Foodborne Pathogens Disease*, 14, 558–563. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2295>
- Tarradas, C., Perea, A., Vela, A. I., Goyache, J., Dominguez, L., Fernandez-Garaizabal, J. F., ... Luque, I. (2004). Distribution of serotypes of *Streptococcus suis* isolated from diseased pigs in Spain. *Veterinary Record*, 154, 665–666. <https://doi.org/10.1136/vr.154.21.665>
- Varela, N. P., Gadbois, P., Thibault, C., Gottschalk, M., Dick, P., & Wilson, J. (2013). Antimicrobial resistance and prudent drug use for *Streptococcus suis*. *Animal Health Research Reviews*, 14, 68–77. <https://doi.org/10.1017/S1466252313000029>
- Yap, P. S. X., Yip, B. C., Ping, H. C., & Lim, S. H. E. (2014). Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The Open Microbiology Journal*, 8, 6–14. <https://doi.org/10.2174/1874285801408010006>
- Zeng, Z. K., Zhang, S., Wang, H. L., & Piao, X. S. (2015). Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: A review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6, 10.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: de Aguiar FC, Solarte AL, Tarradas C, et al. Antimicrobial activity of selected essential oils against *Streptococcus suis* isolated from pigs. *MicrobiologyOpen*. 2018;e613. <https://doi.org/10.1002/mbo3.613>